Circulardichroismus und Konfiguration von α-Aminosäuren

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Jens-Georg Hansen

aus Wesermünde

1969

Circulardichroismus und Konfiguration von α-Aminosäuren

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Jens-Georg Hansen

aus Wesermünde

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.1969

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meiner Frau

Meinem verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr.H. A u t e r h o f f

danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung . . . . . S. 1

1.1. Literaturübersicht 5

1.2. Problemstellung 13

2. Hauptteil 14

2.1. N-Phthalyl-α-aminosäuren 14

2.1.1. Darstellungsmethoden 14

2.1.2. Messung im Dichrographen 15

2.1.3. CD-Kurven 20

2.2. 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus α-Aminosäuren . . 29

2.2.1. Darstellungsmethoden 29

2.2.2. Racemisierung 31

2.2.3. Messung im Dichrographen 32

2.2.4. CD-Kurven 36

2.3. 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus α-Methylaminosäuren45

2.3.1. Trennung des R,S-Isovalins in optische Antipoden 45

2.3.2. Die absolute Konfiguration des (+)-Isovalins . . 46

2.3.3. (-)-2-Methyl-3',4'-dihydroxyphenylalanin 50

2.3.4. Darstellung des α-Methylleucins, Trennung in optische Antipoden 53

2.3.5. Konfiguration und Cotton-Effekte des 3-Phenyl-2-thiohydantoins aus (-)-α-Methylleucin . . . 55

2.4. Erfahrungen mit anderen Chromophoren 57

2.5. Vergleich der verschiedenen Chromophore, Diskussion 57

2.6. Zusammenfassung 60

3. Beschreibung der Versuche 62

1. Einleitung

Nach den ersten Untersuchungen von W.Kuhn[1] über den Circulardichroismus im Jahre 1930 dauerte es fast 25 Jahre, bis das Interesse für die Spektropolarimetrie wieder erwachte. Erst ab Mitte der fünfziger Jahre stieg die Anzahl der Publikationen sprunghaft an. Der Grund dafür und für die Tatsache, daß sich das Interesse zunächst der Messung der mit dem Circulardichroismus (CD) verwandten Optischen Rotationsdispersion (ORD) zuwandte, war, daß Spektropolarimeter und Dichrographen nicht allgemein zur Verfügung standen. Heute sind die technischen Probleme gelöst und beide Methoden ein selbstverständliches Hilfsmittel zur Lösung stereochemischer Fragen geworden.

Das Hauptmerkmal einer optisch aktiven Substanz ist ihre "circulare Doppelbrechung", worunter die Ungleichheit der Brechungsquotienten für rechts und links circular polarisiertes Licht zu verstehen ist. Da die Geschwindigkeit des Lichts in einem Medium gegeben ist durch $v=c/n$, wobei c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und n den Brechungsquotienten des Mediums darstellt, wirkt sich die circulare Doppelbrechung als Unterschied in der Fortpflanzungsgeschwindigkeit von links und rechts circular polarisiertem Licht aus. Dadurch schwingt die resultierende Welle zwar noch in einer Ebene, d.h. sie ist linear polarisiert, die Polarisationsebene ist aber um einen bestimmten Winkel aus der Nullage nach rechts oder links gedreht. Da sich die Brechungsquotienten in reziproker Weise mit der Wellenlänge ändern, ist also die spezifische Drehung ebenso von der Wellenlänge abhängig. Trägt man die optische Drehung gegen die Wellenlänge des polarisierten Lichts auf, so erhält man Rotationsdispersionskurven.

Werden rechts und links circularpolarisierte Wellen auch noch verschieden stark absorbiert, so schwingt der resultierende Vektor nicht mehr entlang einer Sinuskurve, sondern die Spitze des Vektors beschreibt eine Ellipse. Die resultierende Welle wird als elliptisch polarisiert bezeichnet.

---

1) W.Kuhn und E.Braun, Z.physik.Chem. 8, 445 (1930)

Das Phänomen ist als Circulardichroismus bekannt. Gemessen wird die Absorptionsdifferenz für rechts und links circular polarisiertes Licht.

Die Erscheinungen des Circulardichroismus und der Optischen Rotationsdispersion im Bereich einer Absorptionsbande optisch aktiver Substanzen werden nach ihrem Entdecker als Cotton-Effekt (CE) bezeichnet. Die ORD Kurve zeigt im Bereich der Absorptionsbande ein "anomales" Verhalten (Abb.1). Die sogenannte normale (schlichte) ORD Kurve ist oft nichts anderes als der langwellige Ausläufer einer anomalen ORD Kurve.

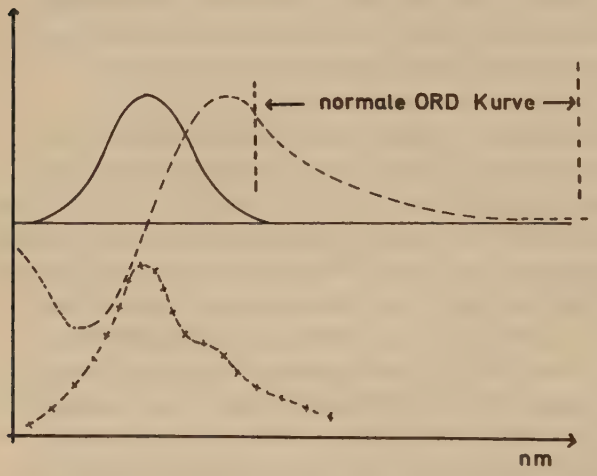


Abb. 1: —— CD Kurve
---- ORD Kurve
+-+- UV Absorptionskurve

Ähnlich wie die Zusammenhänge zwischen Absorption und Dispersion (Abb. 2) liegen sie bei CD und ORD, mit dem Unterschied, daß letztere negative oder positive Vorzeichen haben. Man spricht von einem negativen oder positiven Cotton-Effekt (Abb.3).

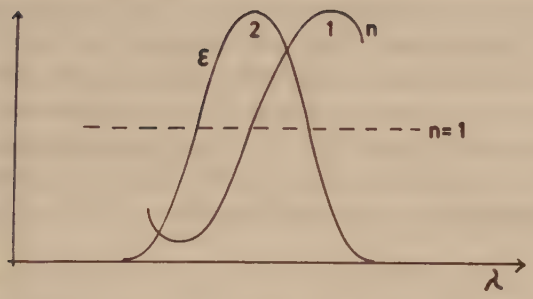


Abb.2: Brechungsindex (Kurve 1) und Absorptionskoeffizient (Kurve 2) in der Nähe einer isolierten Absorptionsbande (idealisiert).

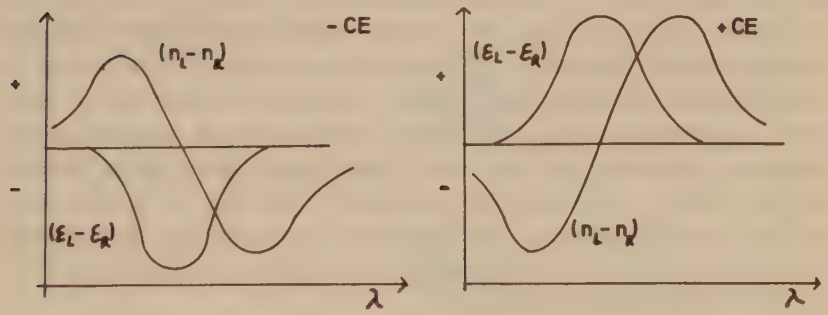


Abb.3: Idealisierte Cottoneffekte einer isolierten Absorptionsbande[2].
n = Brechungsindex, ε = Absorptionskoeffizient

Die Voraussetzung zur Messung eines Cottoneffektes ist, daß die zu messende optisch aktive Substanz im erreichbaren Spektralbereich eine "optisch aktive Absorptionsbande"[3] auf-

---

2) nach A.Abu-Shumays, J.J.Duffield, Analytic.Chem. 7,29 A (1966)

3) W.Kuhn, Tetrahedron (London) 13, 1 (1961)

weist, d.h. es muß ein optisch aktiver Chromophor[4] vorhanden sein.

Optisch aktiv ist ein Chromophor, der entweder in sich dissymmetrisch ist (z.B. Hexahelicin) oder der in sich symmetrisch, aber durch die chirale Umgebung in der Symmetrie seiner Elektronenverteilung gestört ist (z.B. Carbonylgruppe in einem Steroid)[3]. Die optische Aktivität von Chromophoren mit induzierter Asymmetrie ist weitaus schwächer als die des ersten Typus.

Die mit dem CD zu untersuchenden Substanzen müssen neben optischer Aktivität ein Absorptionsmaximum geringer Extinktion im meßbaren Bereich (220 nm - 600 nm) besitzen.

Die Konfiguration optisch aktiver α-Aminosäuren konnte bis vor kurzem[5] nicht mit Hilfe des optischen Circulardichroismus untersucht werden, da die handelsüblichen Dichrographen Messungen nur bis zu einer unteren Wellenlänge von 220 nm gestatteten. Der bei der längsten Wellenlänge absorbierende Chromophor einer aliphatischen α-Aminosäure ist die Carboxylgruppe, deren n-π^* Übergang bei etwa 215 nm erscheint. Man ist daher darauf angewiesen, chromophore Gruppen in die Moleküle einzuführen, damit die optisch aktive Absorptionsbande zu längeren Wellenlängen verschoben wird. Dazu bieten sich bei einer α-Aminosäure Veränderungen an der Aminoguppe, an der Carboxylgruppe oder an beiden zugleich an. Praktische Bedeutung haben Substitution an der NH_2-Gruppe und an der NH_2- und COOH-Gruppe erlangt.

---

4) A.Moscowitz, Tetrahedron (London) 13, 48 (1961)

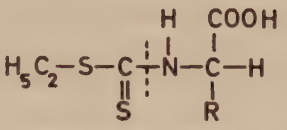
5) M.Legrand, R.Viennet, Bull.Soc.chim.France, 1, 679 (1965)

1.1. Literaturübersicht

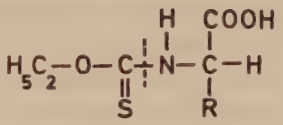
Bisher sind folgende Derivate beschrieben worden:

A) Veränderungen an der NH_2-Gruppe:

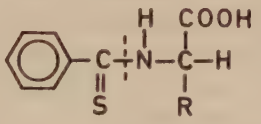
I. Dithiocarbamate



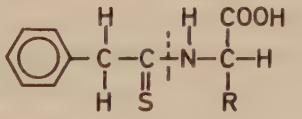
II. Monothiocarbamate
(N-Thionocarbäthoxyderivate)



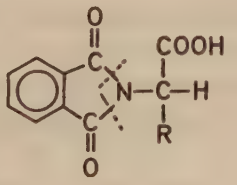
III. N-Thiobenzoylderivate



IV. N-Phenylthioacetylderivate

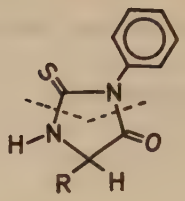


V. N-Phthalylderivate



B) Veränderungen an der NH_2- und COOH-Gruppe:

I. 3-Phenyl-2-thiohydantoine



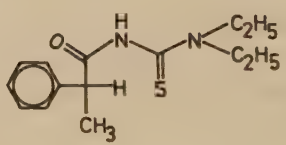
Veränderungen an der Carboxylgruppe wurden bisher nur bei optisch aktiven Carbonsäuren beschrieben[6,7].

---

6) C.Djerassi, K.Undheim, A.M.Weidler, Acta chem.scand. 16, 1147 (1962)

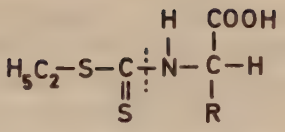
7) W.S.Briggs, C.Djerassi, Tetrahedron (London) 21, 3455(1965)

z.B. N,N-Disubstituierte N-Acylthioharnstoffe:



A.I. Dithiocarbamate

Zuerst wurden Dithiocarbamate von Aminosäuren bei ORD Messungen angewendet[8]. Ihr UV-Spektrum zeigt eine Schulter um 330 nm, die eine geringe Extinktion hat. Sie kann einem optisch aktiven Chromophor zugeordnet werden. Es wurden die N-Dithiocarbalkoxyderivate von L-Alanin, L-Valin, L-Phenylglycin, L-Isoleucin, L-Alloisoleucin, L-Prolin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure und L-Cystin in Methanol vermessen. Alle zeigten einen positiven Cotton-Effekt (CE), so daß gefolgert wurde, die Konfiguration der L-Aminosäuren könne aus dem Vorzeichen des CE der N-Dithiocarbalkoxyderivate abgeleitet werden. Vergleichende CD und ORD Untersuchungen von Dithiocarbamaten[9] aus L-Alanin, L-Prolin in Methanol, L-Asparaginsäure in Dioxan[10] lassen ebenfalls diesen Schluß zu.



Tieftemperaturmessungen[11], die eingeführt wurden, um Konformationsgleichgewichte zu studieren, zeigen, daß für eine Beziehung zwischen CE Vorzeichen und Konfiguration die "rotamere Zusammensetzung" um Einfachbindungen innerhalb der Umgebung des Chromophors mehr oder weniger fixiert sein muß. N-Dithiocarbäthoxy-L-asparaginsäure und N-Dithiocarbäthoxy-L-glutaminsäure zeigen bei sinkenden Temperaturen ein starkes Anwachsen der Amplitude der CD Kurven, während N-Dithiocarbomethoxy-L-prolin eine geringe Zunahme zeigt. Daraus folgt, daß bei $+25^{\circ}$ die Kurve der Dithiocarbamate die Summe der CE der Rotationsisomere zeigt, während bei -192° das stabilste Rotationsisomer überwiegt. Beim cyclischen L-Prolinderivat ist freie Rotation am wenigsten möglich, so daß schon bei $+25^{\circ}$ die energetisch günstigste Orientierung vorliegt.

---

8) C.Djerassi, B.Sjöberg, A.Fredga, J.Amer.chem.Soc. 81, 5002 (1959)

9) C.Djerassi, H.Wolf, E.Bunnenberg, J.Amer.chem.Soc. 84, 4552 (1962)

10) siehe dazu W.S.Briggs, C.Djerassi, Tetrahedron 21, 3461 (1965) ref. 32

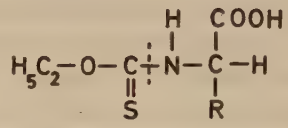
11) W.S.Briggs, C.Djerassi, Tetrahedron 21, 3461 (1965)

ORD und CD Messungen von N-Dithiocarbäthoxy-L-alanin in verschiedenen Lösungsmitteln[12,13] zeigten interessante Aspekte. In Wasser, Methanol, Dioxan, Tetrahydrofuran und Eisessig resultiert ein positiver Cotton-Effekt, in Chloroform und Dichlormethan ein negativer. Daß die NH-Bindung am Lösungsmitteleffekt teilhat, zeigt ein positiver CE von N-Dithiocarbäthoxy-N-methyl-L-alanin in Methanol, Dioxan, Chloroform (also anders als beim nicht N-methylierten Derivat) und Benzol.

II. Monothiocarbamate

(N-Thionocarbäthoxyderivate)

Diese Derivate wurden ebenso wie die Thiohydantoine für die Sequenzanalyse von Peptiden gebraucht[14]. Das UV-Spektrum zeigt eine intensive Bande bei 247 nm (log $\varepsilon \sim 4{,}2$) und eine leichte Schulter bei 280 nm (log $\varepsilon \sim 2{,}2$). Für ORD Messungen [15] wurden die Derivate von L-Alanin, L-Methionin, L-Phenylalanin, S-Benzyl-L-cystein, L-Valin, L-Leucin, L-Prolin, L-Allohydroxyprolin, L-Hydroxyprolin und L-Acetoxyprolin in Methanol verwendet. Mit Ausnahme von N-Thionocarbäthoxy-L-hydroxyprolin (- CE) zeigten alle Derivate einen positiven Cotton-Effekt. Die Schulter im UV-Spektrum entspricht einem "optisch aktiven Elektronenübergang".



CD Messungen[9] von N-Thionocarbäthoxy-L-hydroxyprolin ergaben in Dioxan einen negativen CE, N-Thionocarbäthoxy-L-phenylalanin zeigt in Methanol einen positiven CE.

---

12) S.Yamada, K.Ishikawa, K.Achiwa, Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 13, 892 (1965)

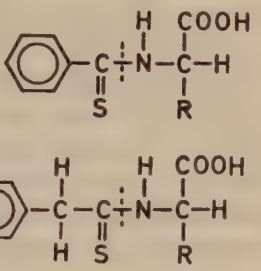
13) S.Yamada, K.Ishikawa, K.Achiwa, Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 14, 921 (1966)

14) G.W.Kenner, H.G.Khorana, J.chem.Soc.(London) 1952, 2076

15) C.Djerassi, K.Undheim, R.C.Sheppard, W.G.Terry, B.Sjöberg, Acta chem.scand. 15, 903 (1961)

III., IV. N-Thiobenzoyl- und N-Phenylthioacetylderivate

Diese Derivate zeigen UV-Absorptionsbanden geringer Extinktion bei 365 nm (log $\varepsilon \sim 2{,}4$) und 330 nm (log $\varepsilon \sim 1{,}8$). Beide entsprechen optisch aktiven Chromophoren. Sie wurden zuerst bei ORD Untersuchungen angewendet[16]. Da diese Derivate meist ölig anfielen, wurden sie in vielen Fällen als Cyclohexylammoniumsalze isoliert und vermessen.



Die N-Thiobenzoylderivate von L-Leucin, L-Asparagin, L-Glutaminsäure zeigten in Methanol positive Cotton-Effekte, N-Thiobenzoyl-L-prolin einen negativen.

Die N-Phenylthioacetylderivate von L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Asparagin und L-Phenylalanin zeigten in Methanol negative CE, N-Phenylthioacetyl-L-prolin und -L-hydroxyprolin positive. Die Abweichungen wurden nicht gedeutet.

In ausführlichen Untersuchungen über N-Thiobenzoyl-L-α-aminosäuren[17,18] schlug G.C.Barret vor, auftretende Anomalien durch Beschränkung auf ein bestimmtes Lösungsmittel, in diesem Falle Äther, zu umgehen. In seinen CD Untersuchungen zeigten die Derivate von L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, L-Leucin, L-Hydroxyprolin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Tyrosin, L-Valin, L-Histidin und L-Lysin in ätherischer Lösung negative CE, die D-Derivate positive.

Die Messung weiterer Derivate zeigte jedoch, daß auch diese Maßnahme nicht genügte. Das CD Verhalten der N-Thiobenzoylderivate wies eine unterschiedliche Abhängigkeit vom Lösungsmittel auf.

Die Cotton-Effekte der obigen Derivate in Äther und Methanol wurden bei 290 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang) nicht im Vorzeichen ver-

---

16) B.Sjöberg, B.Karlen, R.Dahlbohm, Actachem.scand. 16, 1071 (1962)

17) G.C.Barret, J.chem.Soc. (London) 1965, 2825

18) " , J.chem.Soc. (London) 1966, 1771

ändert[19]. Alle L-Derivate zeigten in Äther und Methanol positive CE.

Diese Ergebnisse wurden durch weitere Arbeiten bekräftigt[20]. L-Valin, L-Leucin, L-Tyrosin und L-Prolin wurden als repräsentative Säuren in die N-Thiobenzoylderivate verwandelt und ihre ORD und CD Spektren in wäßrigem Alkali, Methanol, Dioxan und Isooctan aufgenommen. Ein positiver CE trat immer in den stärker polaren Lösungsmitteln auf. Inversion des Vorzeichens wurde bei den L-Valin- und L-Leucinderivaten gefunden, während die L-Tyrosin- und L-Prolinderivate keine Änderung zeigten. In der Phenylthioacetylserie zeigten alle Derivate Vorzeichenumkehrungen.

Ebenfalls bestätigt wurde die Unsicherheit der Aussage über die Beziehung zwischen CE Vorzeichen und Konfiguration durch japanische Arbeiten[21]. In ORD Messungen wurden Lösungsmitteleffekte bei N-Phenylthioacetyl- und N-Thioacetylderivaten von L-Alanin, L-Prolin, L-Asparaginsäure und deren Cyclohexylammoniumsalzen in Wasser, Methanol und Chloroform festgestellt, wobei das Prolinderivat, wie schon bei N-Dithiocarbäthoxy-L-prolin festgestellt, eine Ausnahme machte. Letzteres zeigte sowohl in Methanol und Dioxan als auch in Chloroform einen positiven CE. N-Phenylthioacetyl-L-prolin und seine Salze zeigten in Wasser, Methanol und Chloroform ebenfalls positive CE. Diese Erscheinung wird dadurch erklärt, daß das asymmetrische Zentrum beim L-Prolin in einem starren Ring fixiert ist, während bei den offenkettigen α-Aminosäuren in verschiedenen Lösungsmitteln verschiedene Konformationsisomere vorliegen.

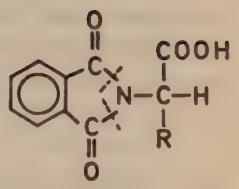
---

19) G.C.Barret, J.chem.Soc. (London) 1967, 1c, 1

20) E.Bach, A.Kajer, Acta chem.scand. 20, 2781 (1966)

21) S.Yamada, K.Ishikawa, K.Achiwa, Chem.pharmac.Bull.(Tokyo) 13, 1266 (1965)

V. N-Phthalyl-L-aminosäuren



Die N-Phthalyl-L-α-aminosäuren wurden aus wahrscheinlich auch technischen Gründen zuerst bei ORD Messungen angewendet[22].

Die N-Phthalylderivate weisen UV-Absorptionsbanden bei 220 nm (log $\varepsilon \sim 4{,}6$) und 292 nm (log $\varepsilon \sim 3{,}3$) auf. Die Entscheidung, ob die 292 nm Bande optisch aktiv ist, konnte nicht gefällt werden, da die Maxima der ORD Kurven nicht erreicht wurden. Wohl aber wurde aus dem Vorzeichen der CE auf die Konfiguration geschlossen. Untersucht wurden die N-Phthalylderivate von L-Valin, L-Histidin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Glutaminsäure und L-Phenylalanin in Methanol. Alle zeigten negative CE, woraus dann gefolgert wurde, N-Phthalylderivate seien ebenso wie die Dithiocarbamate und N-Thionocarbäthoxyderivate zur Konfigurationsbestimmung geeignet. Ein negativer CE deute auf die L-Konfiguration hin. Die obigen Ergebnisse wurden durch weitere ORD Messungen[23] mit den Derivaten von L-Methionin, L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure und L-Phenylalanin in methanolischer Lösung bestätigt.

CD Messungen[24] der N-Phthalylderivate von L-Alanin, L-Valin, L-Leucin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin in Methanol führten zum Nachweis von zwei optisch aktiven Absorptionsbanden oberhalb von 330 nm, die im UV-Spektrum nicht erkennbar sind. Die Derivate konnten wegen der geringen dichroitischen optischen Dichte ΔD ($\Delta D = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot l$) der Absorptionsbande bei 292 nm nur bis 320 nm gemessen werden. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß die N-Phthalylderivate aliphatischer Aminosäuren der L-Serie durch zwei schwache CD-Banden entgegengesetzten Vorzeichens charakterisiert sind, von denen die erste negative ihr Maximum bei etwa 335 nm, die zweite positive ihr Maximum bei etwa 325 nm hat. Die aromatischen N-Phthalylaminosäuren zeigten negative CD Maxima bei 300 nm und 280 nm.

---

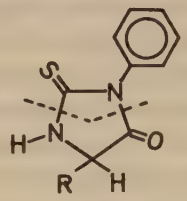
22) C.Djerassi, E.Lund, E.Bunnenberg, J.C.Sheehan, J.org.Chem. 26, 4509 (1961)

23) S.Yamada,K.Achiwa, Chem.pharmac.Bull.(Tokyo)9,412 (1961)

24) H.Wolf,E.Bunnenberg,C.Djerassi, Chem.Ber. 97, 533 (1964)

Tieftemperaturmessungen[7] von N-Phthalyl-L-leucin, -L-alanin und -L-phenylalanin führten zu keinen Ergebnissen, da die Natur der Doppelkurven sowie eine Blauverschiebung des Tals der CD Kurven eine Interpretation erschwerten.

B.I. 3-Phenyl-2-thiohydantoine



Diese von P.Edman zur Endgruppenbestimmung von Peptiden eingeführten Aminosäurederivate[25] boten sich ebenfalls für ORD und CD Messungen an. Sie zeigen ein UV-Absorptionsmaximum im meßbaren Bereich bei 270 nm (log $\varepsilon \sim 4$) sowie eine Schulter um 320 nm, die offensichtlich einem "optisch aktiven Elektronenübergang" entspricht, denn sowohl Maximum der CD Kurven als auch Wendepunkte der ORD Kurven erscheinen in diesem Bereich. ORD Kurven wurden von Thiohydantoinen aus L-Alanin, L-Valin, L-Prolin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin aufgenommen[15]. Sie zeigten positive CE, wobei allerdings die Thiohydantoine aus den aromatischen Aminosäuren nur den Anfang anormaler ORD Kurven aufwiesen, was auf das zweite Absorptionsmaximum zurückgeführt wurde.

Die CD Kurven[9] von Thiohydantoinen aus L-Prolin in Dioxan und L-Alanin in Methanol zeigten für beide Derivate positive CE.

Die Zusammenfassung der sechs bisher vermessenen chromophoren Derivate zeigt, daß der in manchen Arbeiten geäußerte Optimismus verfrüht war. Wurde aus den ersten Arbeiten, in denen nur je zwei bis drei Derivate im Dichrographen vermessen worden sind, noch gefolgert, das Vorzeichen des Cotton-Effektes eines bestimmten Derivates stehe in einer Beziehung zur absoluten Konfiguration, so mußte diese empirische Regel bald eingeschränkt werden. Auftretende Anomalien durch die

---

25) P.Edman, Acta chem.scand. 4, 277 (1950)

Beschränkung auf ein bestimmtes Lösungsmittel zu umgehen, genügte nicht. Die wichtigste Schlußfolgerung war, daß mit Vorsicht vorgegangen werden muß, wenn die absolute Konfiguration acyclischer Moleküle in Systemen, in denen die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff unbekannt sind, nur auf Grund des Vorzeichens des Cotton-Effektes zugeordnet werden soll.

- - - - - - - - - - -

1.2. Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die praktische Anwendbarkeit chromophorer Derivate von α-Aminosäuren zu prüfen. Es soll untersucht werden, welche der Derivate sich für die Messung des Circulardichroismus besonders eignen. Dabei sollen größere Reihen bestimmter Derivate auf ihre einfache und schnelle Darstellung sowie auf Lösungsmitteleffekte bei der Messung im Dichrographen untersucht werden. Die wichtigste Frage ist, ob mit Hilfe des optischen Circulardichroismus die Konfiguration von α-Aminosäuren auf dem Umweg über chromophore Derivate bestimmt werden kann.

2. Hauptteil

2.1. N-Phthalyl-α-aminosäuren

2.1.1. Darstellungsmethoden

Auf Grund ihrer verhältnismäßig einfachen Darstellung und ihrer Verwendung bei Peptidsynthesen müßten sich die N-Phthalylderivate der α-Aminosäuren besonders für die Konfigurationszuordnung eignen, zumal sich die Derivate auch optisch rein darstellen lassen.

Die einfachste Darstellungsmethode ist die Kondensation von Phthalsäureanhydrid und Aminosäure in der Schmelze[26a-e]. Diese Methode hat aber den Nachteil, daß auf mindestens 140° erhitzt werden muß, was in einigen Fällen zur Racemisierung führen kann. Außerdem sind einige α-Aminosäuren wie z.B. Serin, Cystein, Tryptophan besonders hitzeempfindlich. Aus den Säureamiden wie Glutamin und Asparagin entsteht in der Schmelze mit Phthalsäureanhydrid Phthalimid und die entsprechende Aminocarbonsäure.

Die zweite Möglichkeit ist die der Kondensation in flüssiger Phase so z.B. nach der Methode von Wanag[27] in siedendem Eisessig oder in trockenem Dioxan[28]. Hier liegen die angewendeten Temperaturen nicht mehr so hoch (100-115°), aber die Reaktionszeit beträgt bis zu 7 Std. Die Gefahr der Racemisierung besteht nicht mehr, aber die temperaturempfindlichen Aminosäuren können auch so nicht umgesetzt werden.

26a) C.Sheehan, J.C.Chapman, J.Amer.chem.Soc. 74, 3822 (1952)
b) L.Reese, Annal. 242, 1 (1887)
c) M.Fling, F.N.Minard, S.W.Fox, J.Amer.chem.Soc. 69, 2466 (1947)
d) J.H.Billman, W.F.Harting, J.Amer.chem.Soc. 70,1473 (1948)
e) J.C.Sheehan, W.E.Bolhofer, J.Amer.chem.Soc.72,2470 (1950)

27) G.Wanag, Chem.Ber. 75, 1558 (1942)

28) C.Sheehan, M.Goodman, G.P.Hess, J.Amer.chem.Soc. 78, 1367 (1956)

Die wohl eleganteste Methode ist die Phthalierung der Aminosäure mit N-Carboäthoxyphthalimid im Alkalischen bei Raumtemperatur[29] (Abb.4).

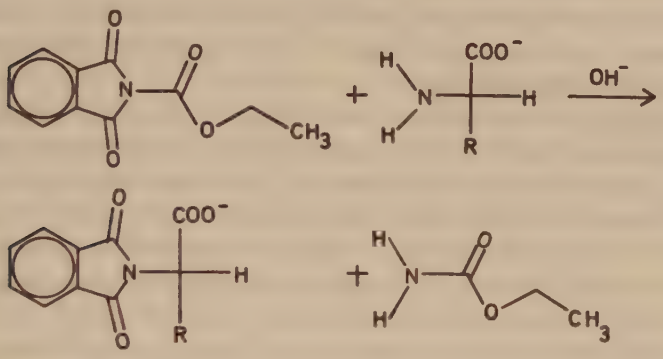


Abb.4

Die Reaktionszeit beträgt in der Regel nur 15 Min. Allerdings fallen einige Derivate unrein an, die dann durch präparative DC gereinigt wurden. Die N-Phthalylderivate sind gut kristallisierende Verbindungen.

2.1.2. Messung der N-Phthalylderivate im Dichrographen

Das UV-Spektrum der N-Phthalylderivate zeigt ein Maximum bei 292 nm (log $\varepsilon \sim 3$) und teilweise eine Schulter um 300 nm. Die Cotton-Effekte liegen im Bereich einer optisch aktiven Absorptionsbande oberhalb von 300 nm, die im UV-Spektrum selbst nicht erkennbar ist. Die Frage, ob die 292 nm Bande optisch aktiv ist, kann mit den zur Zeit gebräuchlichen Dichrographen nicht geklärt werden.

Hier ging es vor allem um die Frage der Konfigurationszuordnung, besonders im Hinblick auf die bei anderen Derivaten aufgetretenen Lösungsmitteleffekte. In der vorliegenden

---

29) G.F.Nefkens, G.J.Tesser, R.J.F.Nivard, Recueil Trav. chim.Pays-Bas 79, 688 (1960)

Arbeit wurden die N-Phthalylderivate folgender L- und D-Aminosäuren im Dichrographen vermessen (siehe Abb.S. 20-28)

L- und D-Alanin, L- und D-Valin, L- und D-Leucin, L-Isoleucin, L-Serin, L-Threonin, L-Methionin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Cystin und L-Lysin in Eisessig, Methanol, Äther, Dioxan und soweit löslich in Tetrachlormethan.

In Eisessig zeigt nur das Derivat des L-Alanins (D-Alanin entsprechend umgekehrt) zwei Maxima entgegengesetzten Vorzeichens. Das erste negative bei 333 nm, das zweite positive unter 330 nm.L-Valin,L-Leucin,L-Isoleucin,L-Serin,L-Threonin, L-Glutaminsäure und L-Histidin zeigen positive Cotton-Effekte, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Cystin negative Cotton-Effekte.

In Methanol weisen nur L-Valin und L-Leucin zwei CD Maxima entgegengesetzten Vorzeichens auf (D-Valin und D-Leucin umgekehrte). Das erste negative liegt um 333 nm, das zweite positive bei etwa 325 nm. L-Isoleucin, L-Serin und L-Threonin zeigen positive Cotton-Effekte, alle anderen Derivate negative.

In Äther zeigt nur L-Leucin zwei entgegengesetzte Maxima. L-Valin, L-Isoleucin, L-Serin und L-Threonin haben positive Maxima, die anderen Derivate nur negative.

In Dioxan sind bei L-Alanin und L-Leucin CD Kurven mit entgegengesetzten Maxima zu beobachten. Die anderen Derivate verhalten sich wie in ätherischer Lösung.

In Tetrachlormethan weisen L-Valin und L-Isoleucin positive Cotton-Effekte mit sehr großer Amplitude auf, L-Alanin und L-Leucin zwei entgegengesetzte CD Maxima. Die übrigen N-Phthalylderivate sind in Tetrachlormethan unlöslich.

Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin sowie das Derivat des Histidins zeigen in allen Lösungsmitteln negative Cotton-Effekte (Ausnahme L-Histidin in Eisessig), deren Maxima mit dem zur Verfügung stehenden Gerät unvollständig gemessen werden können. Bei Konzentrationen von unter 0,1 g/l beträgt der Zeigerausschlag nur 2 mm, was lediglich für qualitative Aussagen von Bedeutung ist.

Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist, treten schon bei dieser kleinen Serie von N-Phthalylderivaten der wichtigsten Aminosäuren in keinem Lösungsmittel einheitliche Cotton-Effekte auf, aus denen man eine Regel ableiten könnte. Bei L-Glutaminsäure und L-Histidin treten in Eisessig sogar Vorzeichenumkehrungen auf.

Die Aufstellung einer Regel für die Zuordnung des Vorzeichens des Cotton-Effektes zur absoluten Konfiguration bei diesen unterschiedlichen Ergebnissen ist nicht möglich. Die N-Phthalylderivate zeigen keine einheitlichen CD Kurven, weil wahrscheinlich durch Wechselbeziehungen mit dem Lösungsmittel entweder verschieden solvatisierte Moleküle oder/und auch vom Lösungsmittel abhängige Rotationsisomere entstehen und diese möglicherweise verschiedene Cotton-Effekte hervorrufen. Ferner sind auch Wasserstoffbrückenbindungen zu berücksichtigen.

Besonders die Natur der Doppelkurven, die aus zwei sich überlagernden CD Kurven entgegengesetzten Vorzeichens entstehen, ist schwer zu interpretieren. Wahrscheinlich werden die überlagerten Cotton-Effekte durch dicht nebeneinanderliegende Absorptionsbanden hervorgerufen, die alle unter der großen Phthalimidbande verborgen sind. Untersuchungen haben gezeigt[30], daß derartig komplexe CD Kurven, die bis etwa 30 nm auseinanderliegende entgegengesetzte Maxima besitzen, durch Überlagerung von zwei einfachen CD Kurven, deren Maxima nur etwa 2 nm auseinanderliegen, entstehen können. Ferner zeigte sich, daß die Rotationskraft der resultierenden Kurve geringer ist als die Summe der beiden einzelnen Kurven. Wenn dann außerdem in verschiedenen Lösungsmitteln teils Doppelkurven, teils einfache Kurven erscheinen, ist eine generelle Aussage nicht möglich.

Gemeinsam ist den nichtaromatischen Monophthalyl-L-aminosäuren entweder eine CD Doppelkurve mit negativem und positivem CE oder eine einfache negative oder positive CD Kurve, wobei die negativen Maxima bei und über 330 nm, die positiven

---

30) K.M.Wellmann, P.H.A.Laur, W.S.Briggs, A.Moscowitz, C.Djerassi, J.Amer.chem.Soc. 87, 73 (1965)

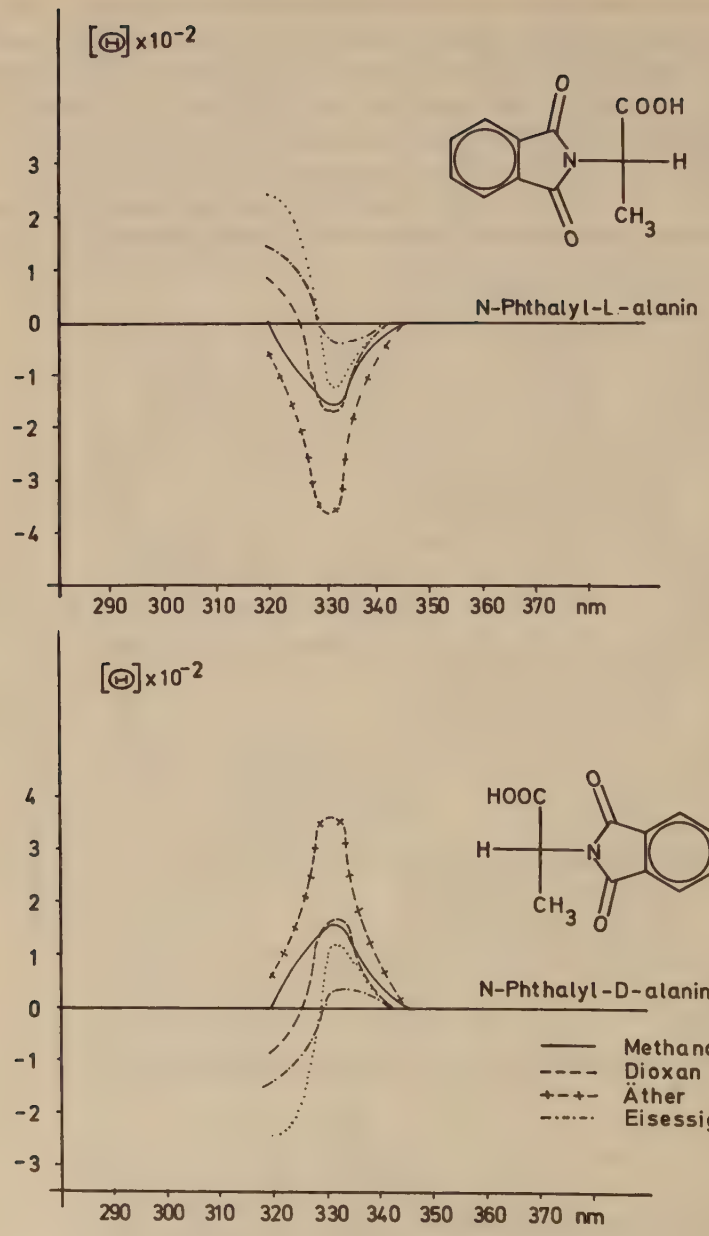
Maxima unter 330 nm liegen. Bei einer Doppelkurve eines L-Derivates ist das erste Maximum immer negativ, wie die CD Kurven von L-Alanin, L-Valin und L-Leucin zeigen. Das Umgekehrte gilt entsprechend für die D-Derivate.

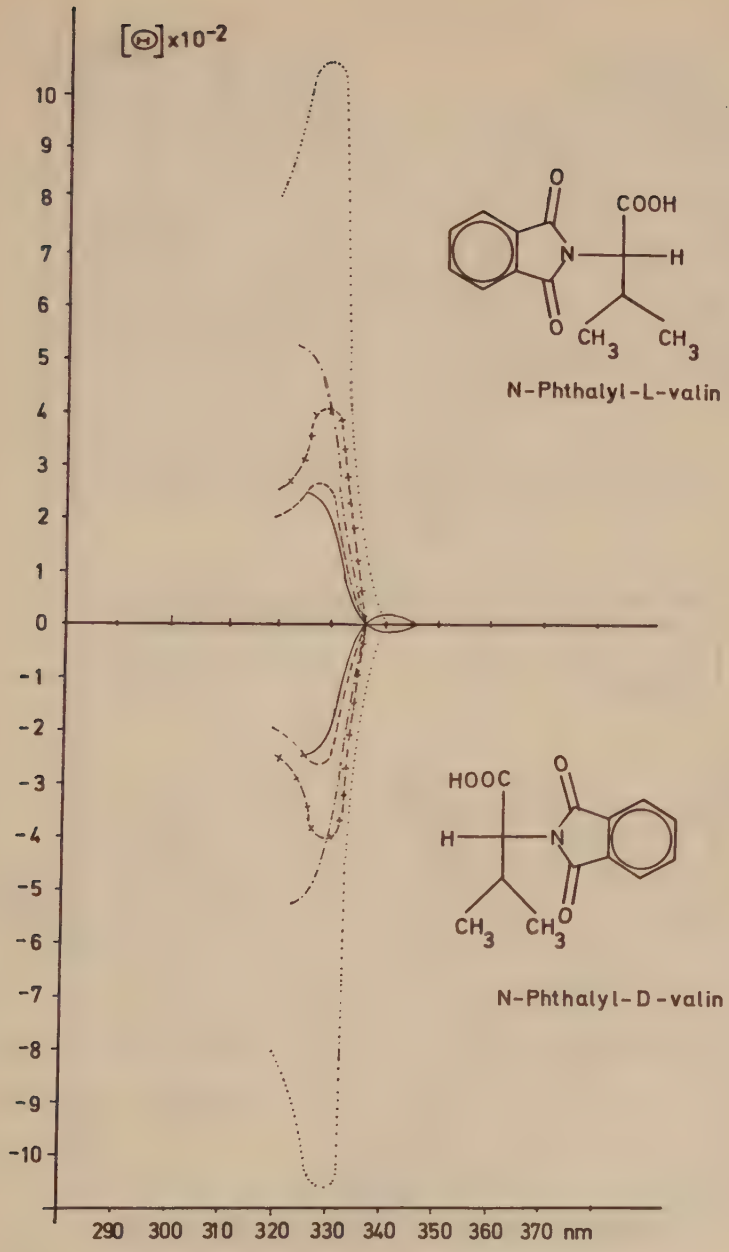
Die CD-Messungen konnten nur bis 320, 315 nm durchgeführt werden, da die Phthalimidabsorptionsbande bei 292 nm ($\varepsilon \sim 1860$) schon zu intensiv ist.

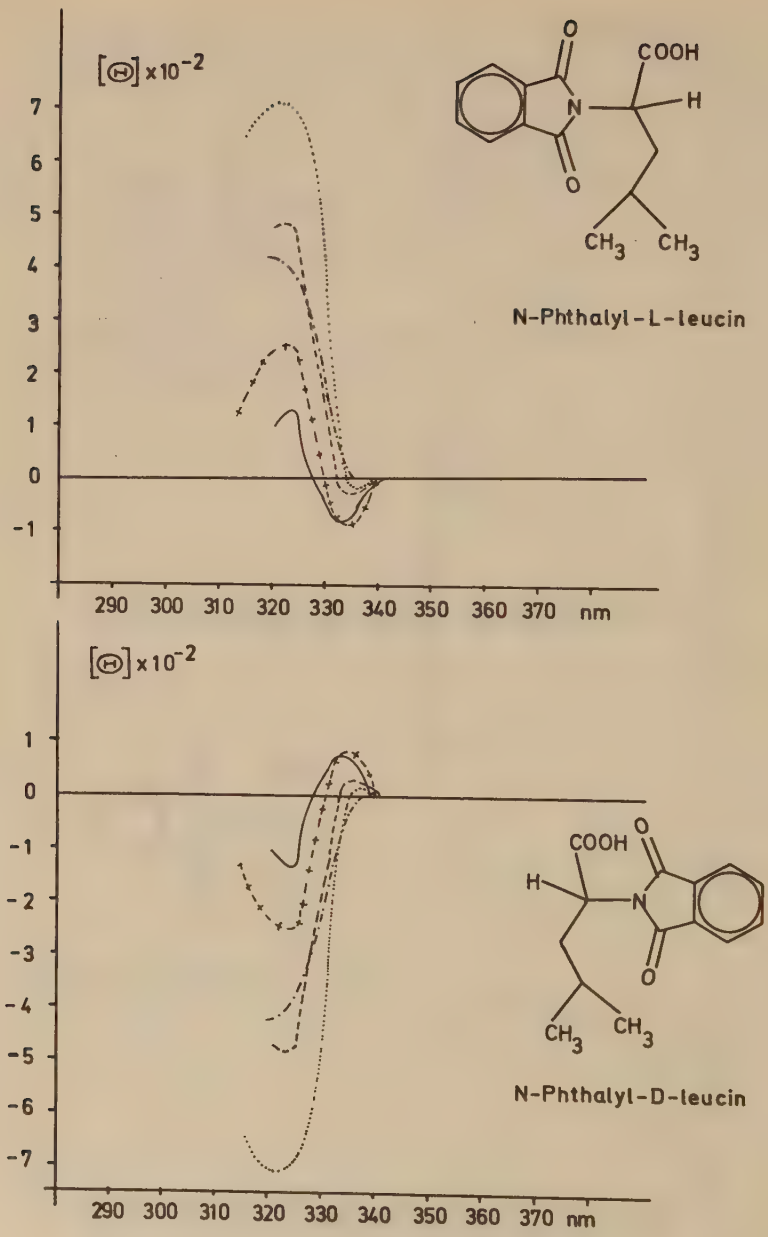
N-Phthalylderivate	Eisessig		Methanol		Äther		Dioxan		Tetrachlormethan	
L-Alanin	-34_{333}	+ ( )	-150_{332}		-362_{331}		-163_{332}	$+81_{320}$	-123_{332}	$+245_{320}$
D-Alanin	$+34_{333}$	- ( )	$+150_{332}$		$+362_{331}$		$+163_{332}$	-81_{320}	$+123_{332}$	-245_{320}
L-Valin		$+525_{324}$	-15_{340}	$+244_{326}$		$+408_{329}$		$+263_{328}$		$+1058_{328}$
D-Valin		-525_{324}	$+15_{340}$	-244_{326}		-408_{329}		-263_{328}		-1058_{328}
L-Leucin		+ ( )	-81_{333}	$+129_{324}$	-85_{334}	$+255_{323}$	-22_{334}	$+487_{323}$	-22_{336}	$+711_{323}$
D-Leucin		- ( )	$+81_{333}$	-129_{324}	$+85_{334}$	-255_{323}	$+22_{334}$	-487_{323}	$+22_{336}$	-711_{323}
L-Isoleucin		$+582_{324}$		$+255_{326}$		$+431_{330}$		$+557_{325}$		$+1056_{329}$
L-Serin		$+402_{324}$		$+232_{327}$		$+328_{328}$		$+677_{326}$	unlöslich	
L-Threonin		$+817_{325}$		$+635_{325}$		$+1963_{326}$		$+1676_{325}$	"	
L-Methionin	-92_{334}		-194_{331}		-254_{333}		-123_{335}		"	
L-Glutaminsäure		+ ( )	-128_{330}		-174_{332}		-90_{333}		"	
L-Glutamin	- - -	- - -	-163_{331}	- - -	- - -	- - - -	- - -	- - -	- - -	- - -
L-Phenylalanin	- ( )		-1694_{330}		-337_{330}		- ( )		unlöslich	
L-Tyrosin	- ( )		-( )		- ( )		- ( )		"	
L-Histidin	+ ( )		-( )		kein Effekt		unlöslich		"	
L-Lysin	kein Effekt		-50_{333}		-122_{333}		-66_{335}		"	
L-Cystin	- ( )			-2209_{320}		-1865_{326}		- ( )	"	

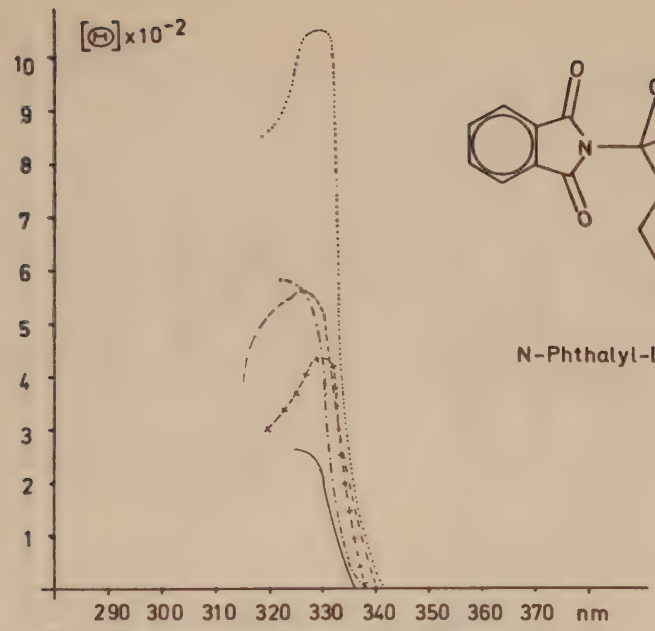
Tabelle 1 : CD Maxima der N-Phthalyl-α-aminosäuren in Einheiten der molaren Elliptizität

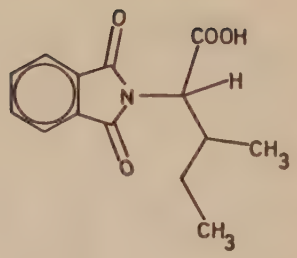
+ ( ) = + CE, Maximum nicht erreicht


[Θ] x10⁻²
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
O
COOH
N
H
CH3
O
N-Phthalyl-L-alanin
[Θ] x10⁻²
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
HOOC
H
N
CH3
O
O
N-Phthalyl-D-alanin
Methanol
Dioxan
Äther
Eisessig

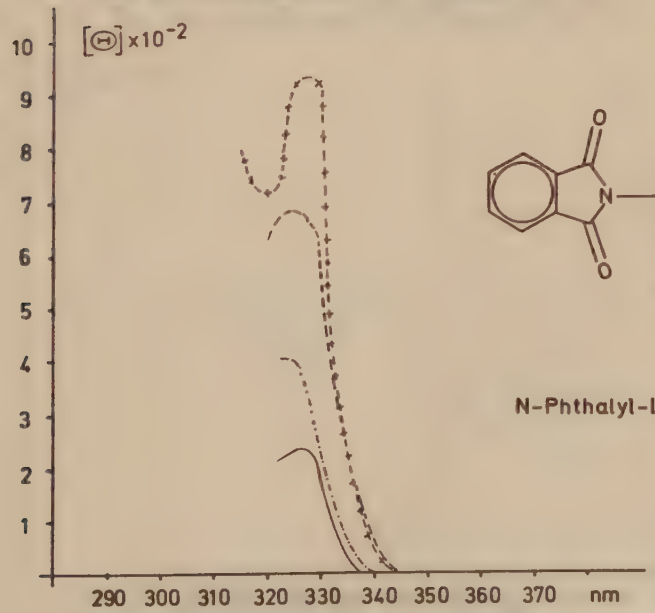

[Θ]x10⁻²
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
COOH
N
H
O
O
CH3
CH3
N-Phthalyl-L-valin
HOOC
H
N
O
O
CH3
CH3
N-Phthalyl-D-valin

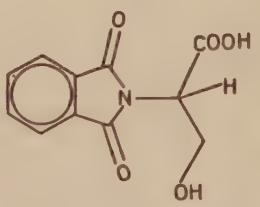

[Θ] x10⁻²
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
O
COOH
N
H
O
CH3 CH3
N-Phthalyl-L-leucin
[Θ] x10⁻²
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
COOH
O
H
N
O
CH3 CH3
N-Phthalyl-D-leucin



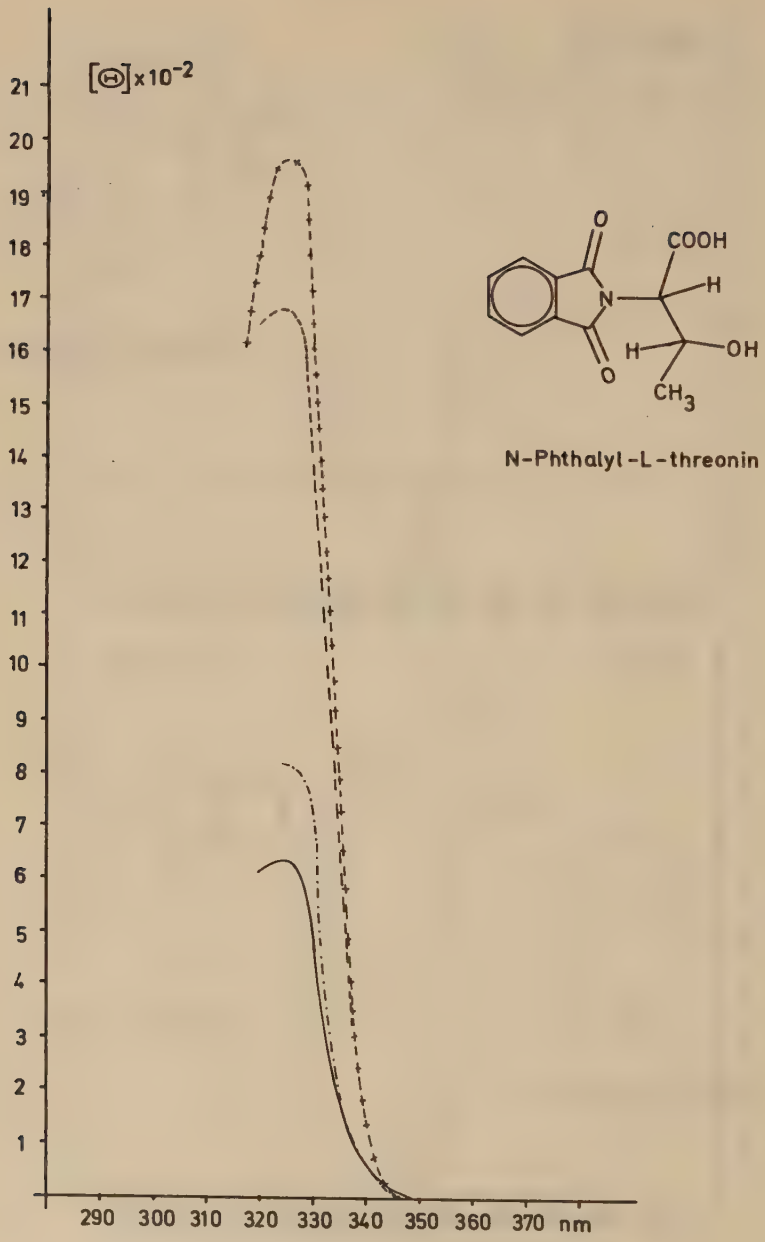


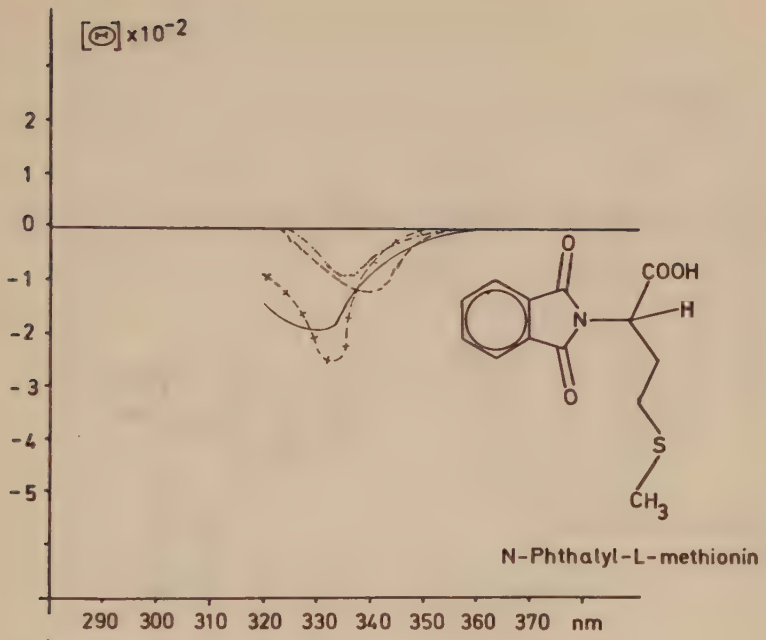
N-Phthalyl-L-isoleucin



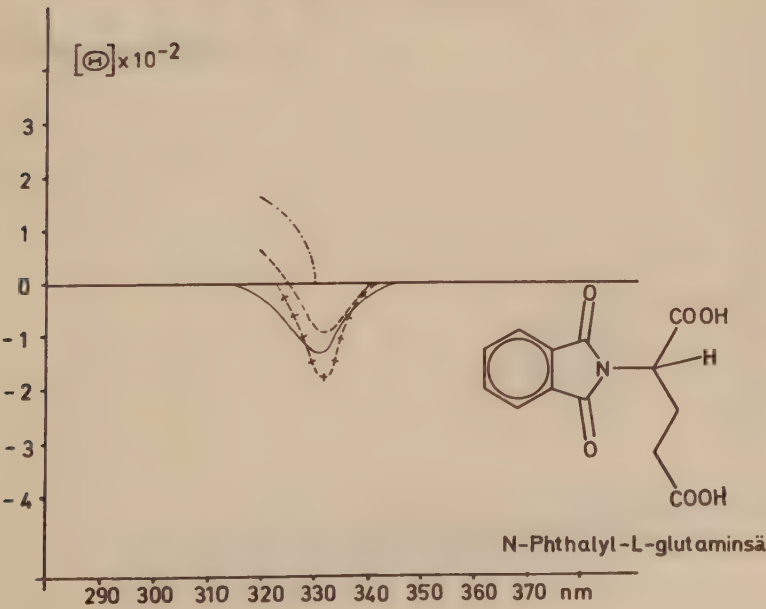


N-Phthalyl-L-serin

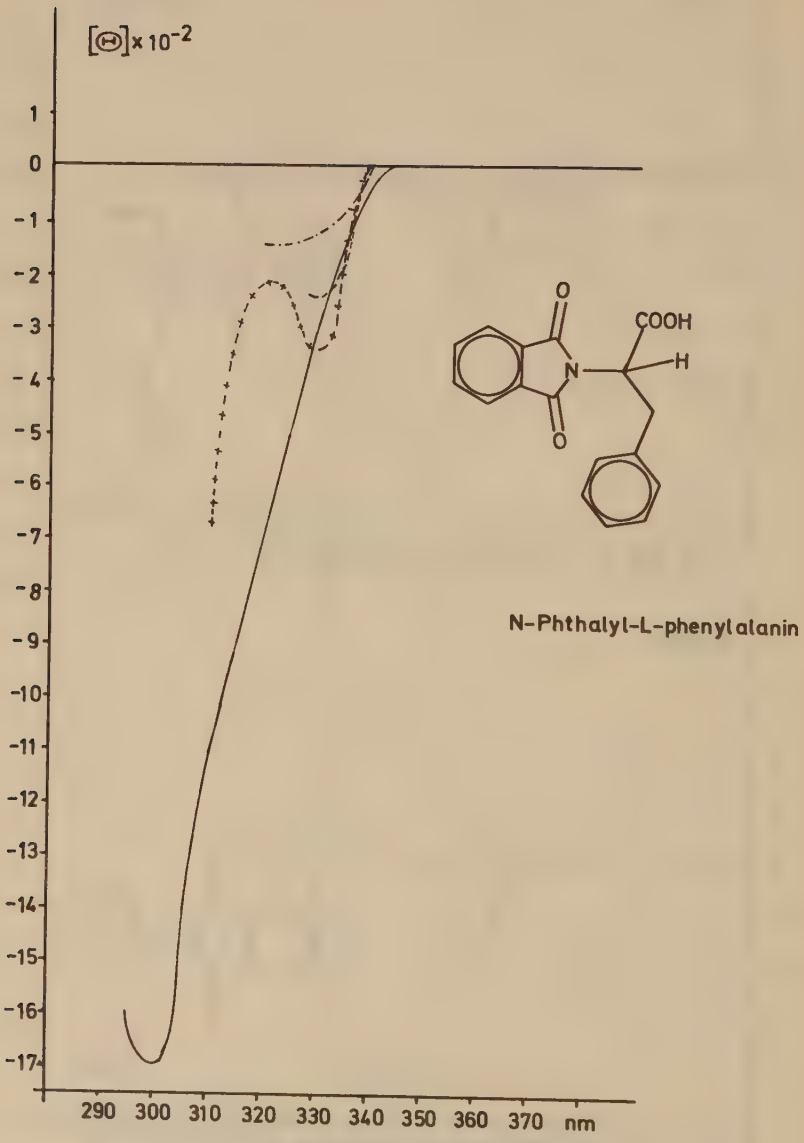

[Θ]x10⁻²
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
O
COOH
H
N
H
OH
O
CH3
N-Phthalyl-L-threonin



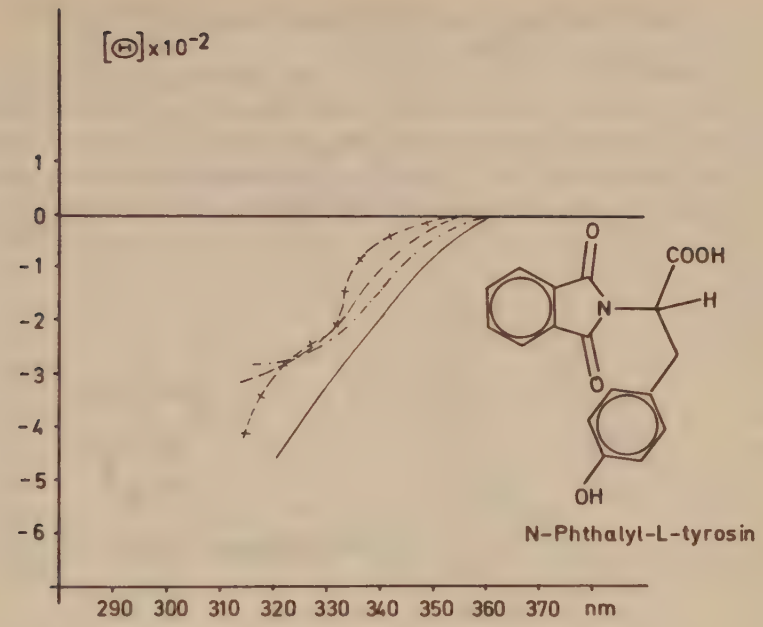
N-Phthalyl-L-methionin



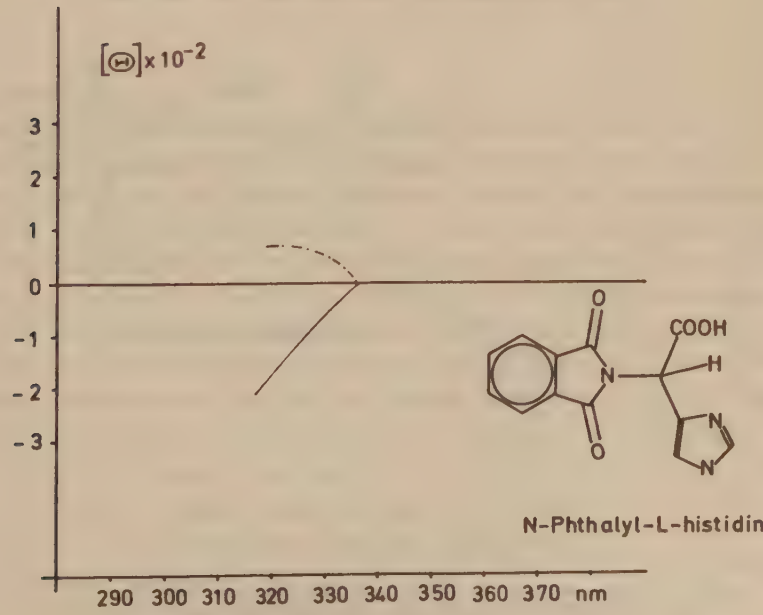
N-Phthalyl-L-glutaminsäure



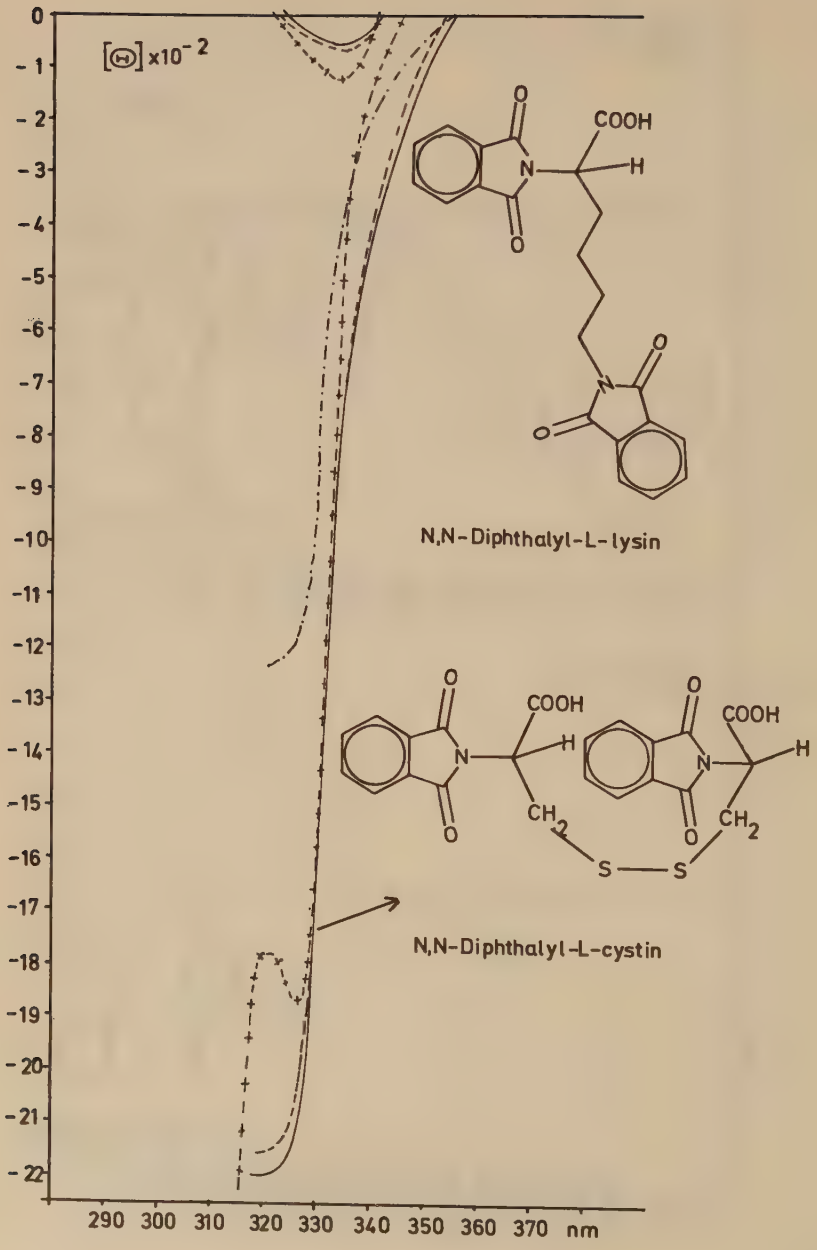
N-Phthalyl-L-phenylalanin



N-Phthalyl-L-tyrosin



N-Phthalyl-L-histidin


[Θ] x10⁻²
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
-12
-13
-14
-15
-16
-17
-18
-19
-20
-21
-22
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
COOH
H
N
O
N,N-Diphthalyl-L-lysin
CH2
S
S
N,N-Diphthalyl-L-cystin

2.2. 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus α-Aminosäuren

2.2.1. Darstellungsmethoden

Die Darstellung dieser sehr gut kristallisierenden Derivate der α-Aminosäuren nach der Methode von P.Edman[25] aus Phenylisothiocyanat und der Aminosäure im Alkalischen ist wenig aufwendig, führt aber meist zu racemischen Produkten[31,32] (Abb.5):

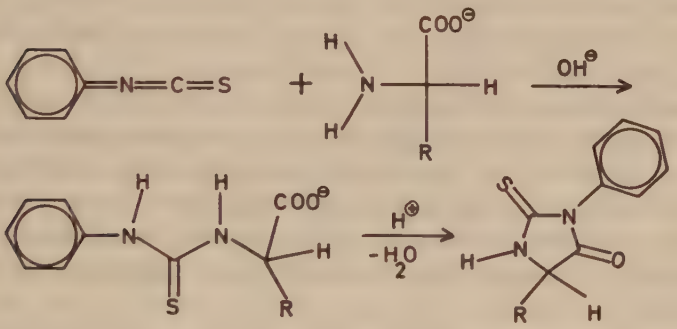


Abb.5

3-Phenyl-2-thiohydantoine wurden zuerst von O.Achan[33] durch Erhitzen der Aminosäure (Alanin, Leucin) mit Phenylsenföl dargestellt. Weitere Derivate wurden von C.A.Brautlecht[34] beschrieben. 1950 führte P.Edman die Thiohydantoine für die Sequenzanalyse von Peptiden ein. Er setzte die Aminosäuren in schwach alkalischer Lösung mit Phenylisothiocyanat bei 40° um und konnte durch Kochen mit Mineralsäuren die Thiohydantoine isolieren. Er beschrieb 15 Derivate. Dabei ergaben 9 eingesetzte optisch aktive Aminosäuren nur 3 optisch aktive Thiohydantoine. PTH-L-Isoleucin $[\alpha]_D^{20}$ +12°, PTH-L-

---

31) A.D.Dakin, J.Amer.chem.Soc. 44, 48 (1910)
32) " " , J.chem.Soc. (London) 1915, 434
33) O.Achan, Chem.Ber. 16, 1544 (1883)
34) C.A.Brautlecht, J.Biolog.Chem. 10, 139 (1911)

Tyrosin $[\alpha]_D^{20}$ -15° (c = 1, Äthanol), PTH-L-Histidin HCl $[\alpha]_D^{20}$ -6° (c = 0,5, Äthanol).

Von Cystin, Serin und Threonin konnten keine Derivate erhalten werden. Während der Reaktion wurde H_2S bzw. H_2O abgespalten. Ingram[35] beschrieb die Darstellung von PTH-Serin und -Threonin, die durch Umsetzung bei Raumtemperatur gelang.

Nachdem C.Djerassi für ORD Messungen[15] einige optisch aktive Thiohydantoine erhalten hatte, sollte versucht werden, durch Änderung der Reaktionsbedingungen eine größere Reihe von optisch aktiven 3-Phenyl-2-thiohydantoinen herzustellen.

Nach der Edman-Methode, d.h. bei 40° Reaktionstemperatur und pH 9 in Pyridin-Wasser 1 + 1, erhielten wir fast nur racemische Derivate. Milderung der Temperatur auf 18 - 20° und des pH auf 8 - 8,5 ergaben bei einer Reaktionszeit von 30 Min. 17 bisher nicht beschriebene optisch aktive Derivate, von denen einige zwar partiell racemisiert sein mögen (siehe PTH-L- und -D-Alanin), die aber doch genügende optische Reinheit zeigen, um ihre Cotton-Effekte im Dichrographen messen zu können.

Die Vermutung, bei einer Umsetzung in saurem Milieu bleibe eine Racemisierung aus, bestätigte sich nicht. L-Leucin und Phenylisothiocyanat in Eisessig 3 Std. am Rückfluß erhitzt, ergaben ein sehr reines, aber racemisches 5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin.

Bei der Umsetzung von L-Lysin wird auch die zweite primäre NH_2-Gruppe substituiert (kein Einfluß auf den Cotton-Effekt wegen zu großer Entfernung vom Asymmetriezentrum).

Es gelang bisher nicht, optisch aktive 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus L-Tryptophan, L-Arginin, L-Cystin und L-Histidin herzustellen. Die Umsetzung von L-Cystein führte auch bei mildesten Bedingungen immer zur Abspaltung von H_2S.

---

35) V.M.Ingram, J.chem.Soc. (London) 1953, 3717

2.2.2. Zur Racemisierung der 3-Phenyl-2-thiohydantoine

Die Racemisierung verläuft im Alkalischen wahrscheinlich über mesomeriestabilisierte Anionen (Abb.6):

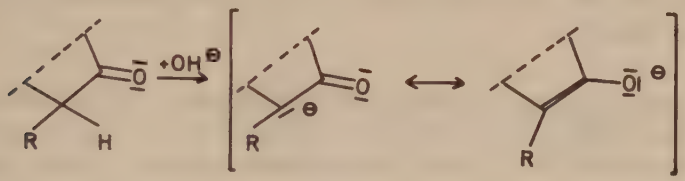


Abb.6

Nach Zusatz eines Tropfens 2n NaOH zu einer 1%igen methanolischen Lösung von L-5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin sinkt die spez. Drehung sehr schnell von -75° auf Null. Nach Zusatz eines Tropfens 2n HCl bleibt die spez. Drehung Null. Also ist Racemisierung eingetreten. Bei einem 5,5-disubstituierten Hydantoin dürfte dies nicht erfolgen. Zum Beweis haben wir optisch aktives Isovalin (2-Methyl-2-aminobuttersäure) dargestellt, das anstelle des Wasserstoffs am asymmetrischen C eine Methylgruppe trägt. Der Drehwert des aus linksdrehendem Isovalin ($[\alpha]_{Hg}^{20}$ -11°(c = 1, Wasser)) dargestellten 5-Äthyl-5-methyl-3-phenyl-2-thiohydantoins sinkt nach Laugenzusatz zwar auch schnell, erreicht aber auf Zusatz eines Tropfens 2n HCl wieder seinen ursprünglichen Wert ($[\alpha]_{Hg}^{20}$ $+7^{\circ}$ (c = 1, Methanol)).

Ein Tropfen 2n HCl in 10 ml einer 1%igen methanolischen Lösung von L-5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin verändert die spez. Drehung auch nach Stunden nicht.

Optisch aktives Isovalin ergab unter den von P.Edman empfohlenen Bedingungen in drei Versuchen optisch aktive Thiohydantoine mit immer gleichen Drehwerten. Auch die Antipoden wiesen genau entgegengesetzte Drehwerte auf.

Bei Untersuchungen über Hydantoine stellte Bovarnich[36] fest, daß am N-1 methylierte Hydantoine stärker zur Racemi-

---

36) M.Bovarnich, H.T.Clarke, J.Amer.chem.Soc. 60, 2426 (1938)

sierung neigen und Substitution des H in N-3 durch Phenyl die Racemisierungsgeschwindigkeit erheblich erhöht. Es wäre also evtl. zu untersuchen, ob sich aus anderen Isothiocyanaten weniger zur Racemisierung neigende Thiohydantoine darstellen lassen.

2.2.3. Messung der 3-Phenyl-2-thiohydantoine im Dichrographen

Da bei diesen Derivaten das asymmetrische C in einem starren Ring fixiert ist, sind im Gegensatz zu den offenkettigen chromophoren Derivaten stärkere Cotton-Effekte und geringe oder keine Lösungsmitteleffekte zu erwarten. Zum anderen erscheinen sie als geeignete Derivate, weil sie eine Absorptionsbande geringer Extinktion im meßbaren Bereich besitzen.

Das Maximum bzw. die Schulter bei 320 nm (log $\varepsilon \sim 2$) ist geeignet, den Circulardichroismus mit dem vorhandenen Gerät zu messen. Sie entspricht offensichtlich einem verbotenen $n\text{-}\pi^*$ Übergang, da sie beim Wechsel des Lösungsmittels von Äther zu Methanol eine Blauverschiebung erleidet (Abb.7).

Die 3-Phenyl-2-thiohydantoine wurden in Eisessig, Methanol, Dioxan und Äther gemessen. Stärker apolare Lösungsmittel kamen wegen zu geringer Löslichkeit nicht in Betracht. Derivate mit zusätzlichen Hydroxyl-, Carboxyl- und Amidfunktionen waren schon in Äther schwer oder gar nicht löslich.

Alle 15 Derivate von L-Aminosäuren zeigten in den vier verwendeten Lösungsmitteln positive Cotton-Effekte (siehe Seite 36 ff. und Tabelle 2). Dabei liegen die Maxima in Eisessig bei 319 nm und tiefer. Die meisten Maxima wurden nicht erreicht. Wahrscheinlich ist die $n\text{-}\pi^*$ Bande nach zu tiefen Wellenlängen verschoben. In Methanol liegen die positiven CD Maxima der L-Aminosäurederivate bei etwa 320 nm, in Dioxan bei 328 nm und in Äther bei 330 nm. Diese Ergebnisse stimmen mit der Verschiebung der Schulter des UV-Spektrums überein.

In Äther, dem apolarsten der verwendeten Lösungsmittel, erreichen die Werte der molekularen Elliptizität ihren höchsten Betrag. Auffallend stark ist der Cotton-Effekt des 1,5-Cyclotrimethylen-3-phenyl-2-thiohydantoins. Allerdings zeigt schon L-Prolin eine verhältnismäßig große spez. Drehung,

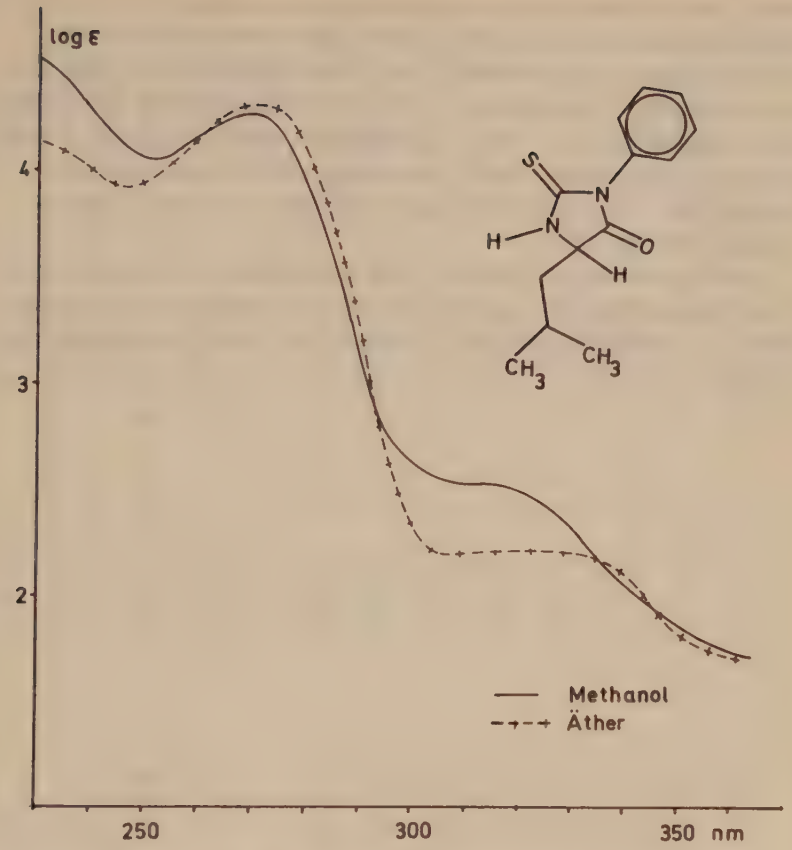


Abb.7: UV-Spektrum von 5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

was allgemein bei cyclischen optisch aktiven Systemen zu beobachten ist.

Zur Kontrolle wurden die 3-Phenyl-2-thiohydantoine von D-Alanin und D-Leucin vermessen. Die Kurven ergaben genaue Spiegelbilder der L-Derivate. Die unterschiedliche Höhe der Maxima beruht auf der unterschiedlichen optischen Reinheit durch verschieden starke Racemisierung.

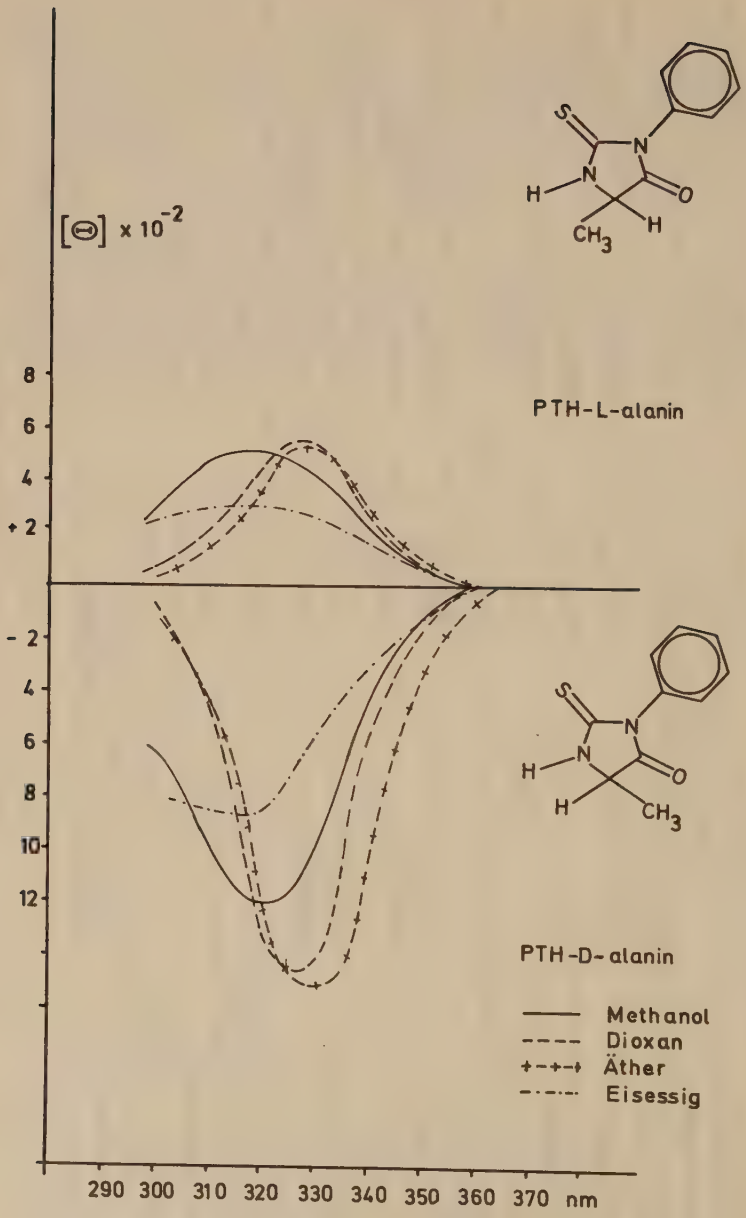
Die 3-Phenyl-2-thiohydantoine scheinen trotz ihrer leichten Racemisierung sehr geeignete chromophore Derivate zu

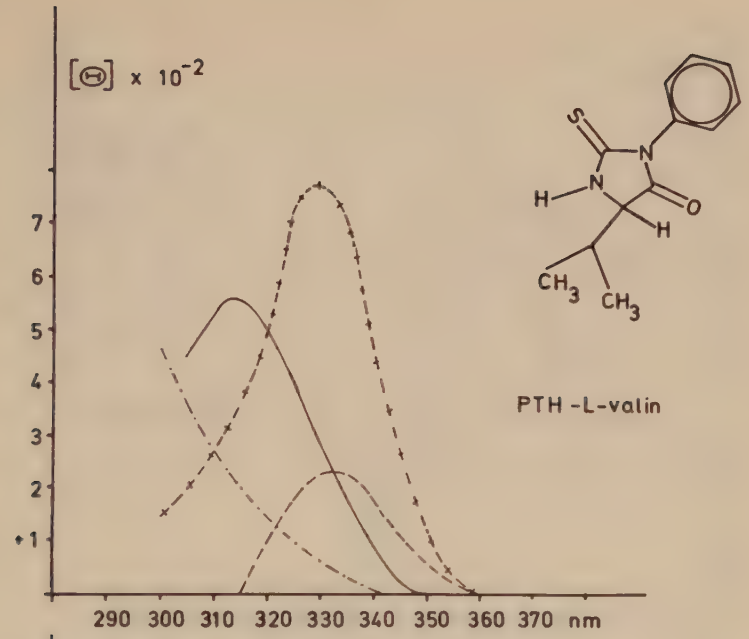
sein. Durch milde Reaktionsbedingungen lassen sich optisch aktive Thiohydantoine darstellen, wenn auch der optische Reinheitsgrad nicht bekannt ist. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung C.Djerassis, daß die Cotton-Effekte der 3-Phenyl-2-thiohydantoine trotz teilweiser Racemisierung zu messen sind. Es traten keine bemerkenswerten Lösungsmitteleffekte auf, was wahrscheinlich auf das cyclische System zurückzuführen ist.

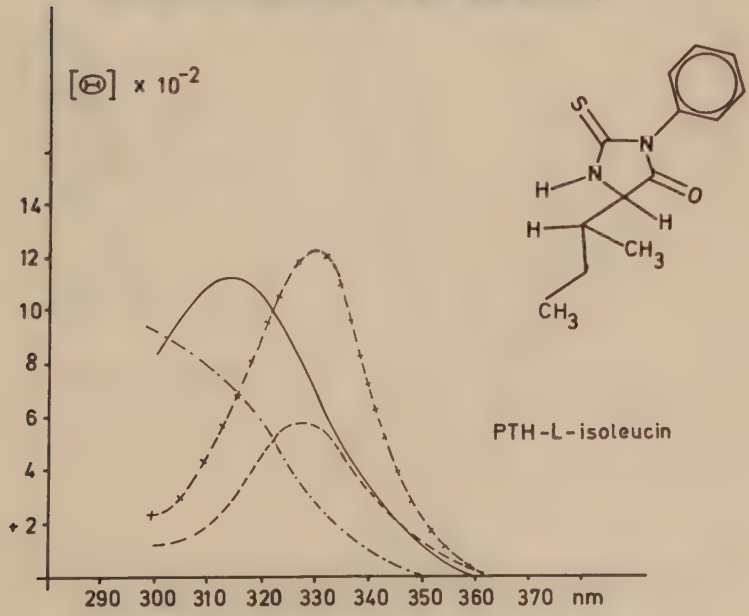
3-Phenyl-2-thiohydantoine aus L-Aminosäuren zeigen positive Cotton-Effekte, aus D-Aminosäuren negative Cotton-Effekte im Bereich einer optisch aktiven Absorptionsbande bei 320 nm.

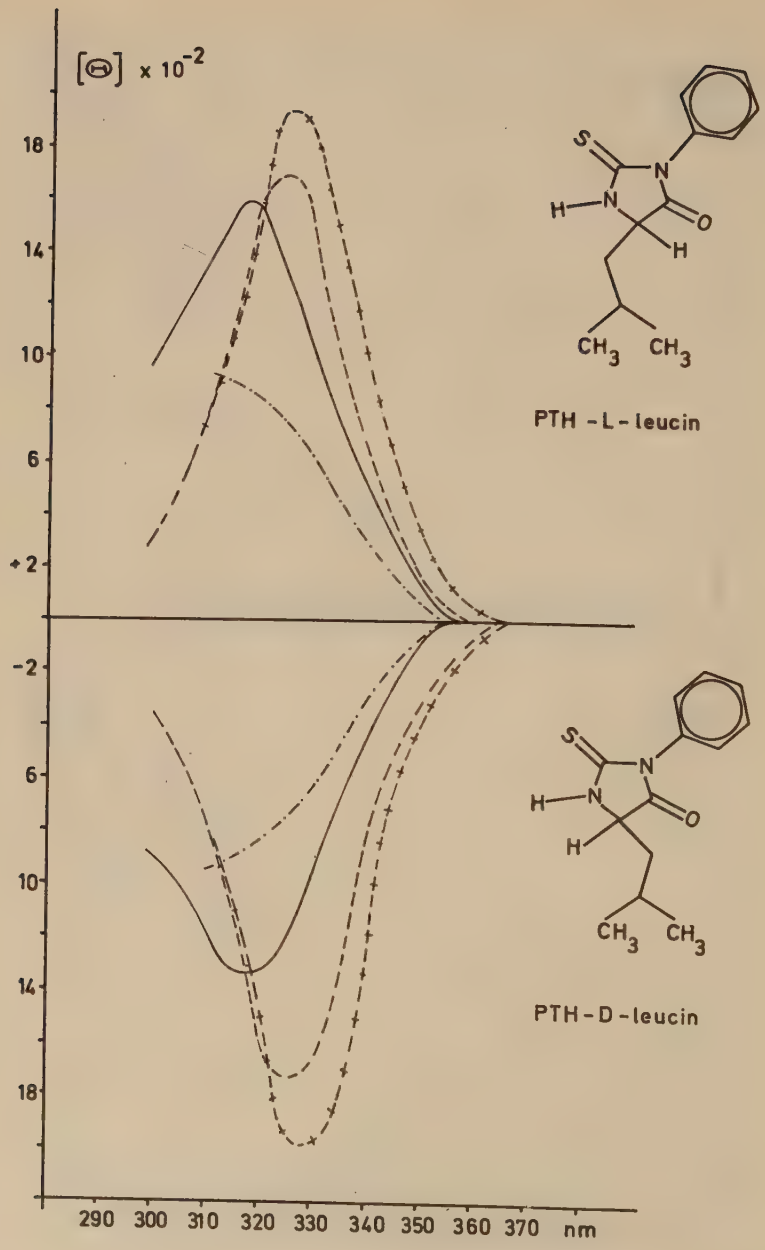
	Eisessig	Methanol	Dioxan	Äther
PTH-L-alanin	$+ 306_{319}$	$+ 510_{319}$	$+ 540_{327}$	$+ 510_{328}$
PTH-D-alanin	$- 888_{319}$	$- 1201_{319}$	$- 1473_{327}$	$- 1552_{329}$
PTH-L-valin	Max.nicht +CE erreicht	$+ 554_{314}$	$+ 223_{329}$	$+ 766_{328}$
PTH-L-leucin	" " +CE	$+ 1584_{318}$	$+ 1690_{325}$	$+ 1929_{327}$
PTH-D-leucin	" " -CE	$- 1366_{318}$	$- 1756_{326}$	$- 2017_{328}$
PTH-L-isoleucin	" " +CE	$+ 1115_{315}$	$+ 553_{328}$	$+ 1230_{329}$
PTH-L-serin	-- - -	$+ 957_{315}$	- - - - -	- - - - - -
PTH-L-threonin	Max.nicht +CE erreicht	$+ 1036_{314}$	$+ 1229_{328}$	sehr schwer +CE löslich
PTH-L-prolin	$+ 7473_{329}$	$+ 5866_{328}$	$+ 7473_{328}$	$+ 7818_{332}$
PTH-L-methionin	Max.nicht +CE erreicht	$+ 1044_{317}$	$+ 1228_{326}$	$+ 1581_{330}$
PTH-L-asparagin	$+ 801_{323}$	$+ 802_{321}$	$+ 1629_{328}$	unlöslich
PTH-L-asparaginsäure	$+ 46_{330}$	$+ 303_{322}$	$+ 248_{330}$	"
PTH-L-glutamin	$+ 1154_{319}$	$+ 1405_{320}$	$+ 1548_{328}$	"
PTH-L-glutaminsäure	$+ 727_{311}$	$+ 750_{318}$	$+ 732_{329}$	"
PTH-L-phenylalanin	Max.nicht +CE erreicht	Max.nicht +CE erreicht	$+ 1426_{328}$	$+ 1411_{330}$
PTH-L-tyrosin	" " +CE	" " +CE	$+ 3329_{328}$	sehr schwer +CE löslich
PTH-L-lysin	$+ 970_{317}$	$+ 1722_{315}$	$+ 1566_{330}$	" +CE

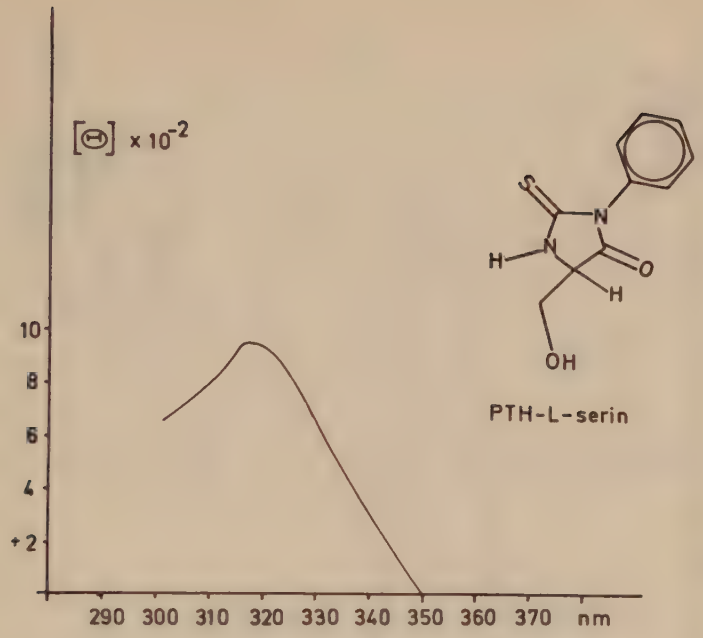
Tabelle 2 : CD Maxima der 3-Phenyl-2-thiohydantoine (PTH) in Einheiten der molaren Elliptizität


[Θ] x 10^-2
8
6
4
+ 2
- 2
4
6
8
10
12
PTH-L-alanin
PTH-D-alanin
Methanol
Dioxan
Äther
Eisessig
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm

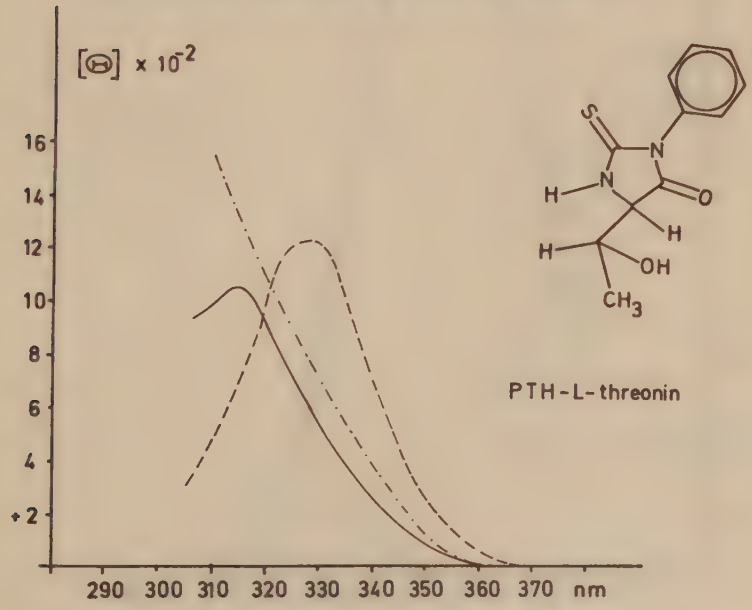

[Θ] x 10^-2
7
6
5
4
3
2
+1
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
S
N
H
N
O
H
CH3
CH3
PTH-L-valin


[Θ] x 10^-2
14
12
10
8
6
4
+2
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
S
N
H
N
O
H
H
CH3
CH3
PTH-L-isoleucin

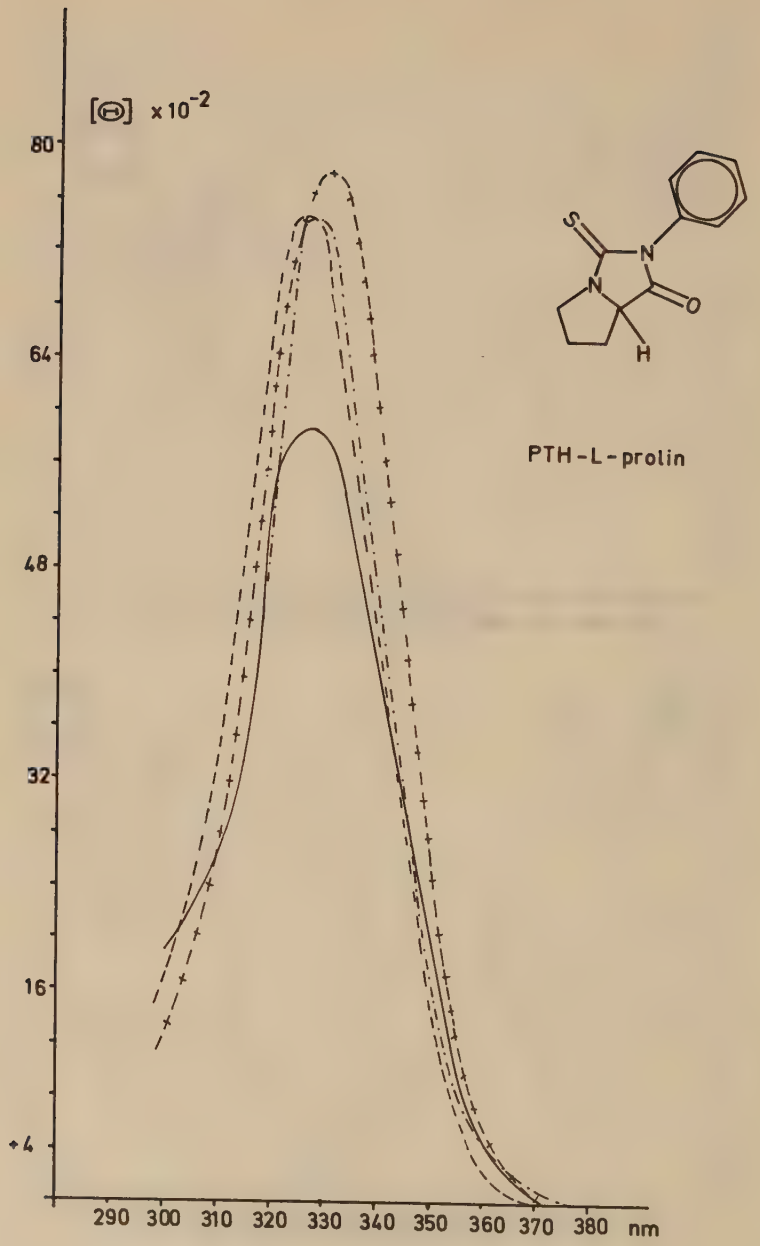

[Θ] x 10^-2
18
14
10
6
+2
-2
6
10
14
18
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
S
N
H
N
O
H
CH3 CH3
PTH -L- leucin
S
N
H
N
O
H
CH3 CH3
PTH-D-leucin

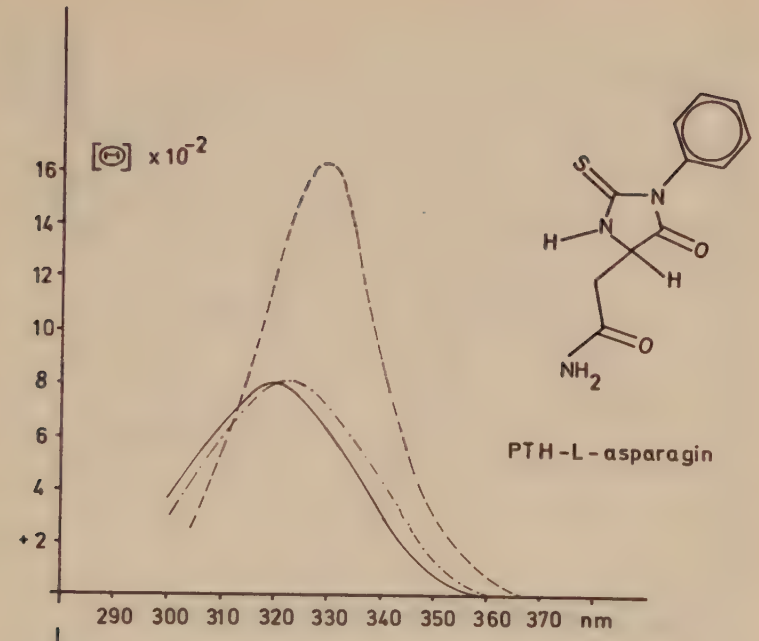


PTH-L-serin

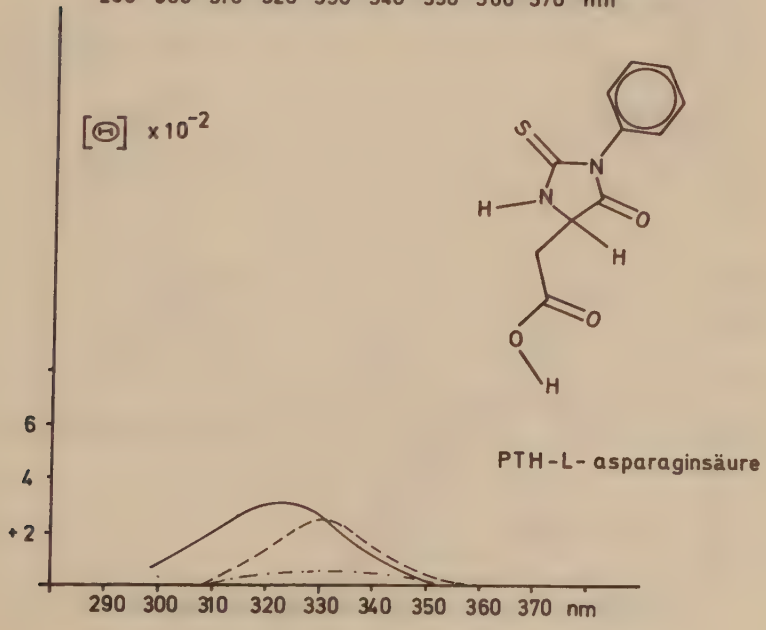


PTH-L-threonin

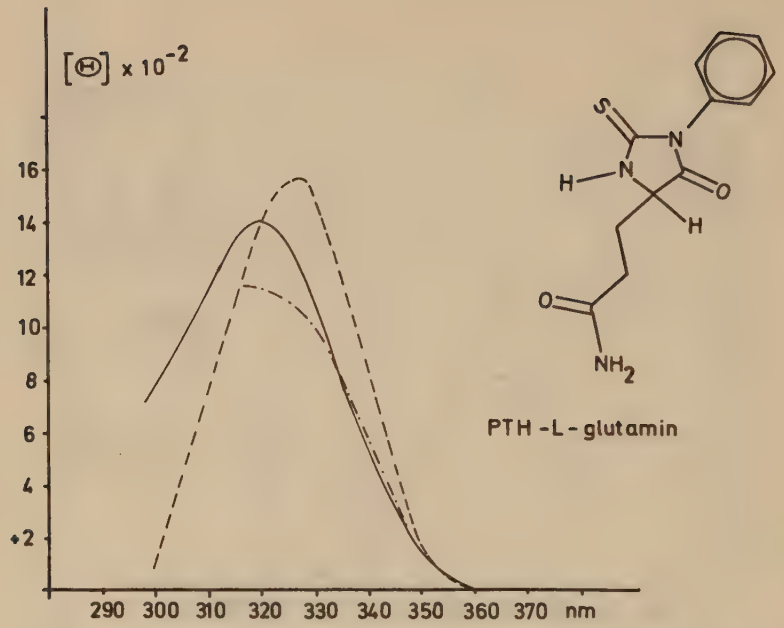

[Θ] x10^-2
80
64
48
32
16
+4
290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 nm
S
N
N
O
H
PTH-L-prolin



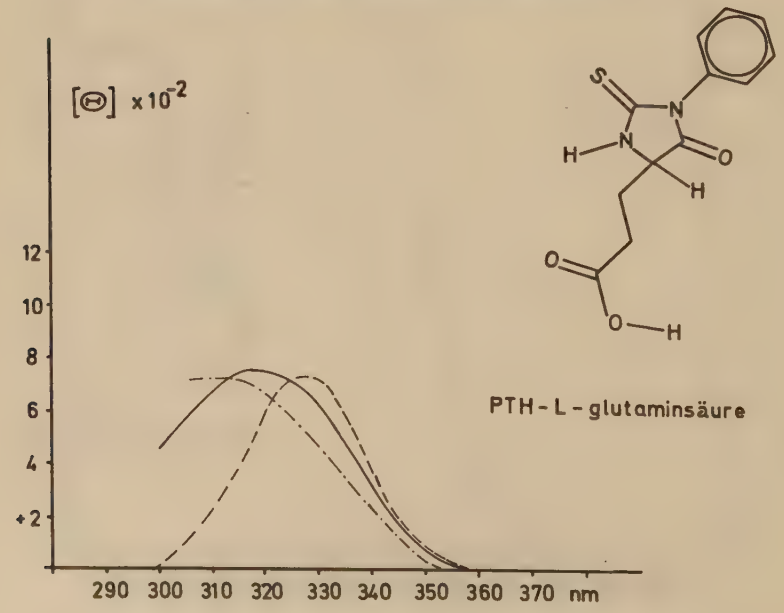
PTH-L-asparagin



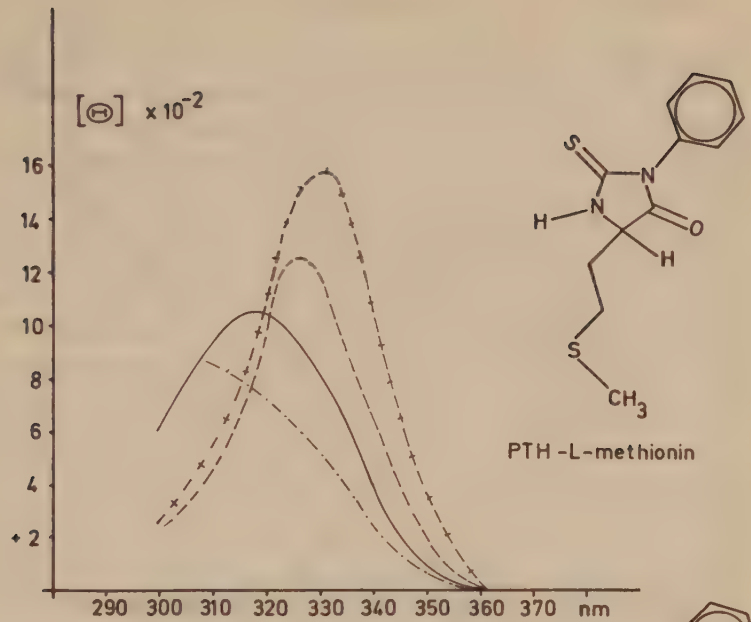
PTH-L-asparaginsäure

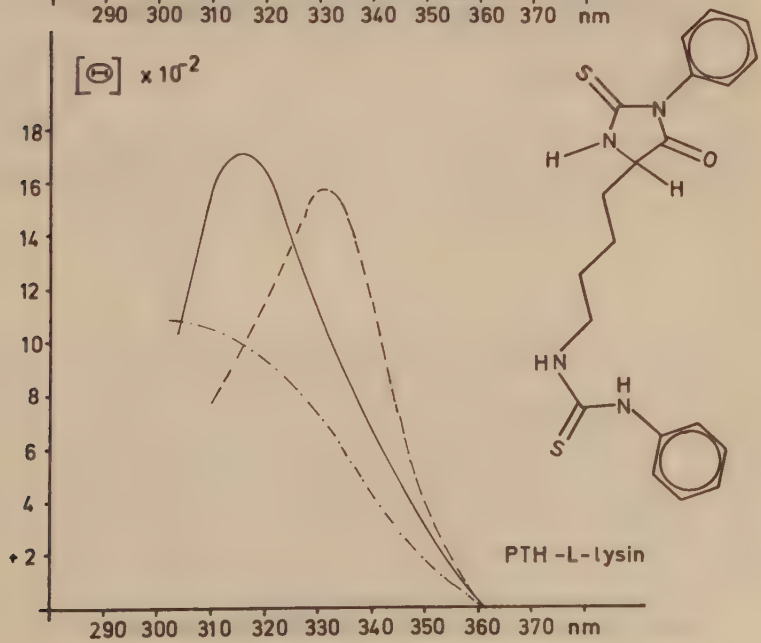


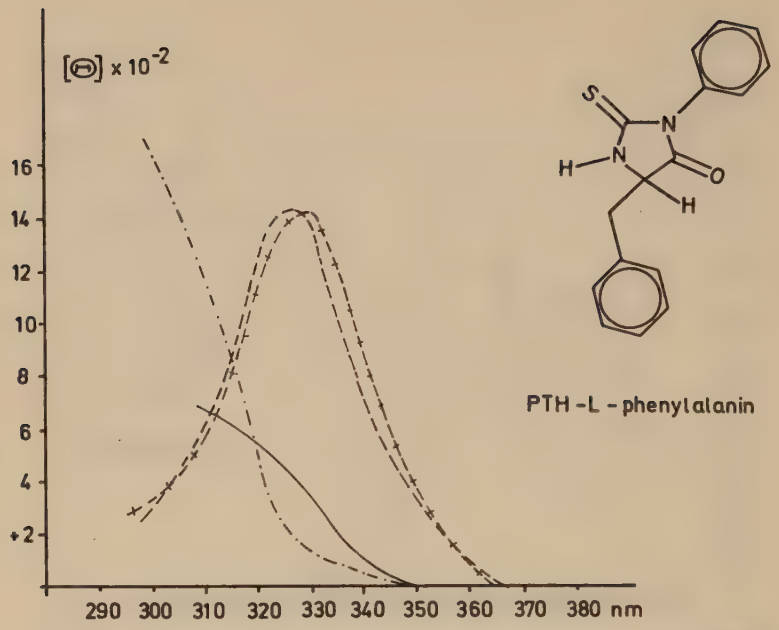
PTH -L- glutamin



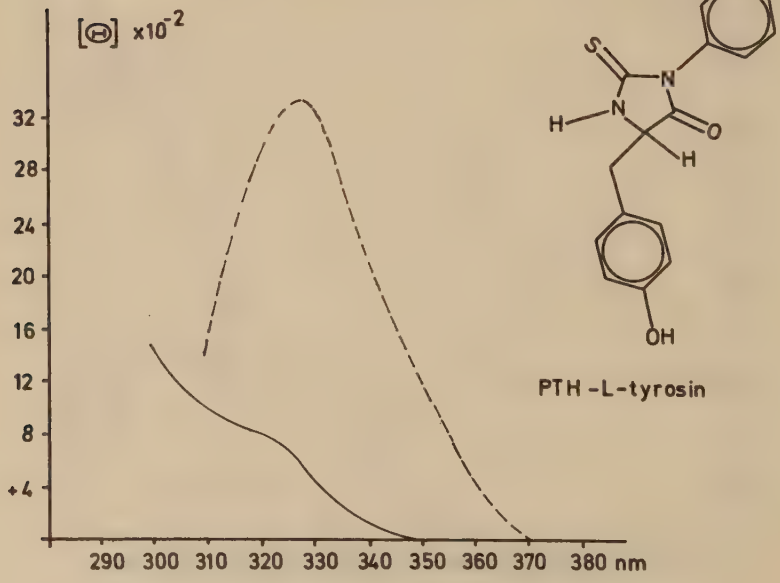
PTH- L- glutaminsäure


[Θ] x 10^-2
16
14
12
10
8
6
4
+2
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
S
N
H
N
O
H
S
CH3
PTH -L-methionin


[Θ] x 10^-2
18
16
14
12
10
8
6
4
+2
290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
S
N
H
N
O
H
HN
H
N
S
PTH -L-lysin



PTH -L - phenylalanin



PTH -L-tyrosin

2.3. 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus α-Methylaminosäuren

Nachdem mit den 3-Phenyl-2-thiohydantoinen bei den α-Aminosäuren in Bezug auf ihre Cotton-Effekte zufriedenstellende Ergebnisse erhalten worden waren, boten sich diese Derivate auch für die Konfigurationszuordnung von α-Methylaminosäuren an. Im Unterschied zu den α-Aminosäuren waren Racemisierungen nicht zu befürchten. α-Methylaminosäuren haben in den letzten Jahren besonders wegen ihrer ausgeprägten pharmakologischen Wirkungen große Beachtung gefunden.

Zur Zeit sind optisch aktive α-Methylaminosäuren kaum im Handel erhältlich. Eine ist bisher als Arzneimittel in die Therapie eingeführt worden, das 2-Methyl-3',4'-dihydroxyphenylalanin (α-Methyldopa).

Isovalin (2-Amino-2-methylbuttersäure) stellt die einfachste α-Methylaminosäure dar. Sie ist nur als Racemat erhältlich und wurde zunächst in ihre Antipoden gespalten. Die absolute Konfiguration der Antipoden war ebenso wie die des α-Methyldopa bekannt. Das bisher in optisch aktiver Form nicht bekannte α-Methylleucin (2-Amino-2,4-dimethylpentancarbonsäure) wurde dargestellt und in seine Enantiomere getrennt.

Die 3-Phenyl-2-thiohydantoine dieser drei α-Methylaminosäuren wurden nach der Edmanmethode dargestellt und in verschiedenen Lösungsmitteln im Dichrographen auf ihre Cotton-Effekte untersucht.

2.3.1. Trennung des R,S-Isovalins in optische Antipoden

Diese α-Methylaminosäure wurde zunächst für die Untersuchung der Racemisierung von Thiohydantoinen gebraucht. Nach einer Vorschrift von E.Fischer[37] wurde die N-Formylverbindung des D,L-Isovalins durch Salzbildung mit Brucin in zwei Diastereomere überführt, die dann durch fraktionierte Kristallisation getrennt wurden. Das N-Formylisovalin konnte nach

---

37) E.Fischer, R.V.Grävenitz, Annal. 406, 1 (1914)

einem neueren Verfahren[38] mit 80%iger Ausbeute gewonnen werden. Die Schutzgruppe wurde mit 5%iger methanolischer HCl abgespalten und die Chloridionen über schwach basischem Anionenaustauscher aus der Lösung entfernt. Durch Acetonzusatz zum Eluat kristallisierte die Aminosäure in feinen Nadeln aus. Das Isovalin aus (+)-Formylisovalin zeigte eine spez. Drehung $[\alpha]_{546}^{20}$ +10,8 (Wasser). Aus der Mutterlauge wurde (-)-N-Formylisovalin und daraus (-)-Isovalin isoliert: $[\alpha]_{546}^{20}$ -11,9 (Wasser). Die Ausbeute war gering: 1,2 g optisch aktives (+)- und (-)-Isovalin aus 14,5 g Racemat. Sie ließe sich aber durch Aufarbeiten von Mutterlaugen vergrößern.

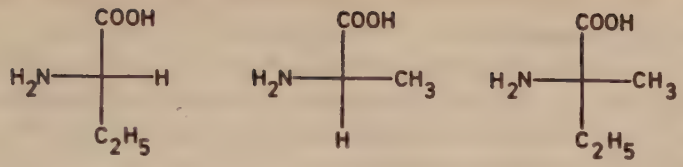
2.3.2. Die absolute Konfiguration des (+)-Isovalins

Für die Racemisierungsversuche wurden die 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus den optischen Antipoden des Isovalins dargestellt: aus (+)-Isovalin ein 5-Methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin $[\alpha]_{546}^{20}$ -7° (c = 1, Methanol). Aus (-)-Isovalin das entsprechende Derivat mit $[\alpha]_{546}^{20}$ +7° (c = 1, Methanol). Die CD Messung ergab für das Thiohydantoin aus (+)-Isovalin im Bereich der 320 nm Bande einen negativen Cotton-Effekt (Abb. S.49), der unerwartet war, da (+)-Isovalin die L-Konfiguration gegeben wird. Diese Tatsache erforderte die Durchsicht der Literatur nach den Angaben über die absolute Konfiguration des optisch aktiven Isovalins.

1908 teilte P.Ehrlich auf Grund des anderen L-Aminosäuren ähnlichen biologischen Verhaltens dem (+)-Isovalin die L-Konfiguration zu[39]. Gemeint war damit die Konfiguration einer L-Aminosäure, in der das H durch Methyl ersetzt ist. Wie ein Vergleich zeigt, ist die Zuordnung nicht ohne weiteres klar[40] (Abb.8). (+)-Isovalin kann als α-Äthyl-D-alanin oder α-Methyl-L-α-aminobuttersäure angesehen werden.

---

38) J.C.Sheehan, H.Yang, J.Amer.chem.Soc. 80, 1154 (1958)
39) P.Ehrlich, A.Wendel, Biochem.Z. 8, 438 (1908)
40) P.Greenstein, Chemistry of the Amino acids, John Wiley + Sons, Inc. New-York-London, 1961, S. 719



L-α-Aminobuttersäure D-Alanin S-(+)-Isovalin
(Schreibweise entgegen
der E.Fischer-Konvention)

Abb.8

Deshalb ist der Vorschlag gemacht worden, die Bezeichnung L und D nicht mehr für α-Methylaminosäuren zu verwenden[41]. S.Yamada schlug für die α-Alkylaminosäuren, die nicht mit Trivialnamen bezeichnet werden, als Präfix α-Methyl vor, z.B. L-α-Methylserin[42]. α-Alkylaminosäuren mit Trivialnamen sollten nach der Nomenklatur von Cahn-Ingold[43] benannt werden. Beim Isovalin also z.B. S-(+)-Isovalin.

Für das Vorliegen der S-Konfiguration des (+)-Isovalins sprach auch der Geschmack[44]. Diese Annahme wurde weiterhin dadurch bestätigt, daß bei der enzymatischen Hydrolyse von N-Chloroacetylisovalin mit Acylase I (+)-Isovalin isoliert wurde[45]. Gegen diese Konfiguration wurde die Clough-Lutz-Jirgenson-Regel[46] angeführt. (+)-Isovalin verhielt sich genau umgekehrt[47].

$[M]_{sauer}$ —— $[M]_{Wasser}$ = $-\Delta[M]$ statt $+\Delta[M]$

Diese im letzten nicht beweisenden Befunde veranlaßten

---

41) A.Neuberger, Advances Protein Chem. 4, 297 (1948)
42) S.Yamada,K.Achiwa, Chem.Pharmac.Bull.(Tokyo) 14,537(1966)
43) R.S.Cahn,C.K.Ingold,V.Prelog, Experientia 12, 81 (1956)
44) T.Kaneto, Nippon Kagahi Kaishi 60, 531 (1939)
45) C.G.Baker u.a., J.Amer.chem.Soc. 74, 4701 (1952)
46) O.Lutz,B.Jirgenson, Chem.Ber. 63,448(1930), 64,1221(1931)
47) M.Winitz, S.M.Birnbaum, J.P.Greenstein, J.Amer.chem.Soc. 77, 716 (1955)

S.Yamada und K.Achiwa zu einer chemischen Untersuchung der absoluten Konfiguration des (+)-Isovalins[48]. Aus D-(-)-Chinasäure I synthetisierten sie ein S-(+)-5-Äthyl-5-methyl-2-pyrrolidinon II, das mit dem aus (+)-Isovalin III dargestellten identisch war. Somit war der Konfigurationsbeweis für das S-(+)-Isovalin erbracht.

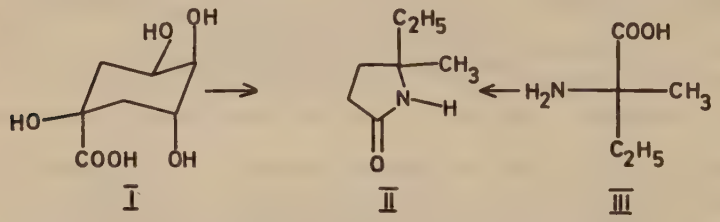


Abb.9

Wie die CD Kurven der 5-Methyl-5-äthyl-3-phenyl-2-thiohydantoine aus S-(+)-Isovalin und R-(-)-Isovalin zeigen (Abb.10, Tabelle 3), treten ebenfalls keine ausgeprägten Lösungsmitteleffekte auf. Die Vorzeichen sind in allen Lösungsmitteln gleich. Im Unterschied zu den 3-Phenyl-2-thiohydantoinen aus L-Aminosäuren entspricht in diesem Fall ein negativer Cotton-Effekt der S- bzw. R-Konfiguration.

In weiteren Versuchen mit α-Methylaminosäuren soll geklärt werden, ob 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus S-α-Methylaminosäuren allgemein negative Cotton-Effekte im Bereich der 320 nm Bande zeigen und diese ebenso wie bei den Thiohydantoinen aus L- und D-Aminosäuren lösungsmittelunabhängig sind.

---

48) S.Yamada, K.Achiwa, Chem.Pharmac.Bull. (Tokyo) 12, 1525 (1964)

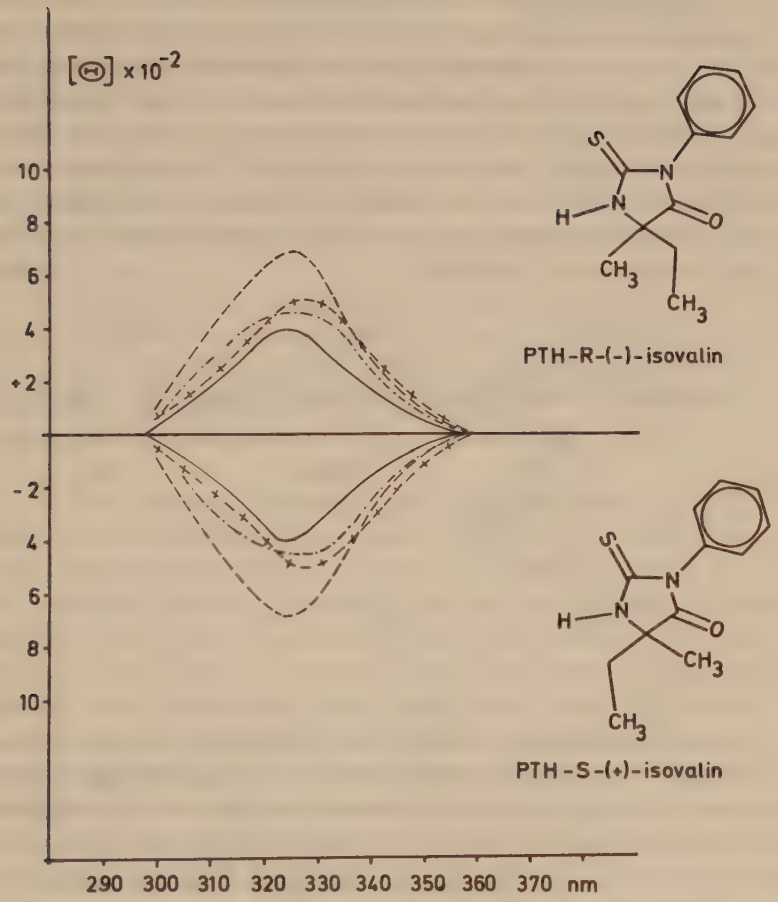


Abb.10

——— Methanol
---- Dioxan
-+-+ Äther
-·-· Eisessig

2.3.3. (-)-2-Methyl-(3',4')-dihydroxyphenylalanin (α-Methyldopa)

Therapeutisch wirksam ist nur die in 0,1 n HCl linksdrehende Form des α-Methyldopas. Die absolute Konfiguration wurde auf Grund des biochemischen Verhaltens und optischer Daten, insbesondere der Anwendbarkeit der Clough-Lutz-Jirgenson-Regel, als L bzw. S vorgeschlagen[49]. Auf chemischem Wege wurde sie dadurch bewiesen, daß sowohl L-α-Methyldopa IV als auch S-(+)-Isovalin V in die (+)-α-Methylasparaginsäure VI überführt werden konnten[50].

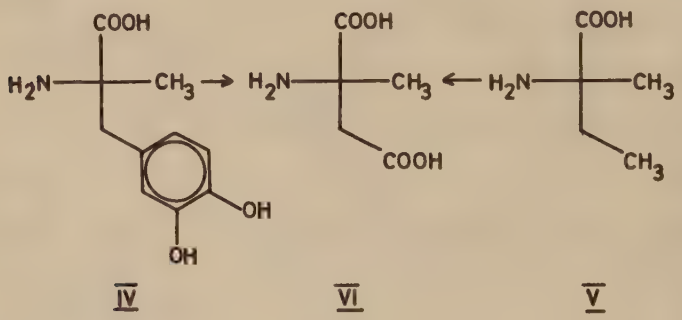


Abb.11

Die Darstellung des 3-Phenyl-2-thiohydantoins aus (-)-α-Methyldopa[x] gestaltete sich wegen der orthoständigen OH-Gruppen am Phenylring etwas schwieriger als bei den bisher beschriebenen Aminosäuren. Da im Alkalischen gearbeitet werden mußte, war unter Luftsauerstoff eine starke rotbräunliche Verfärbung (Orthochinonbildung) nicht zu vermeiden. Unter N_2 blieb die Verfärbung minimal, so daß nach der Edmanmethode umgesetzt werden konnte. Allerdings wurde kein kristallines 5-Methyl-5-(3',4')-dihydroxybenzyl-3-phenyl-2-thiohydantoin erhalten. Die Einheitlichkeit der Substanz

---

49) L.W.Tristan u.a., J.org.Chem. 29, 2053 (1964)

50) S.Yamada, S.Terashima, K.Achiwa, Chem.Pharmac.Bull. (Tokyo) 13, 227 (1965)

x) Wir danken der Firma Farbenfabriken BAYER, Leverkusen, für die Überlassung einer Substanzprobe.

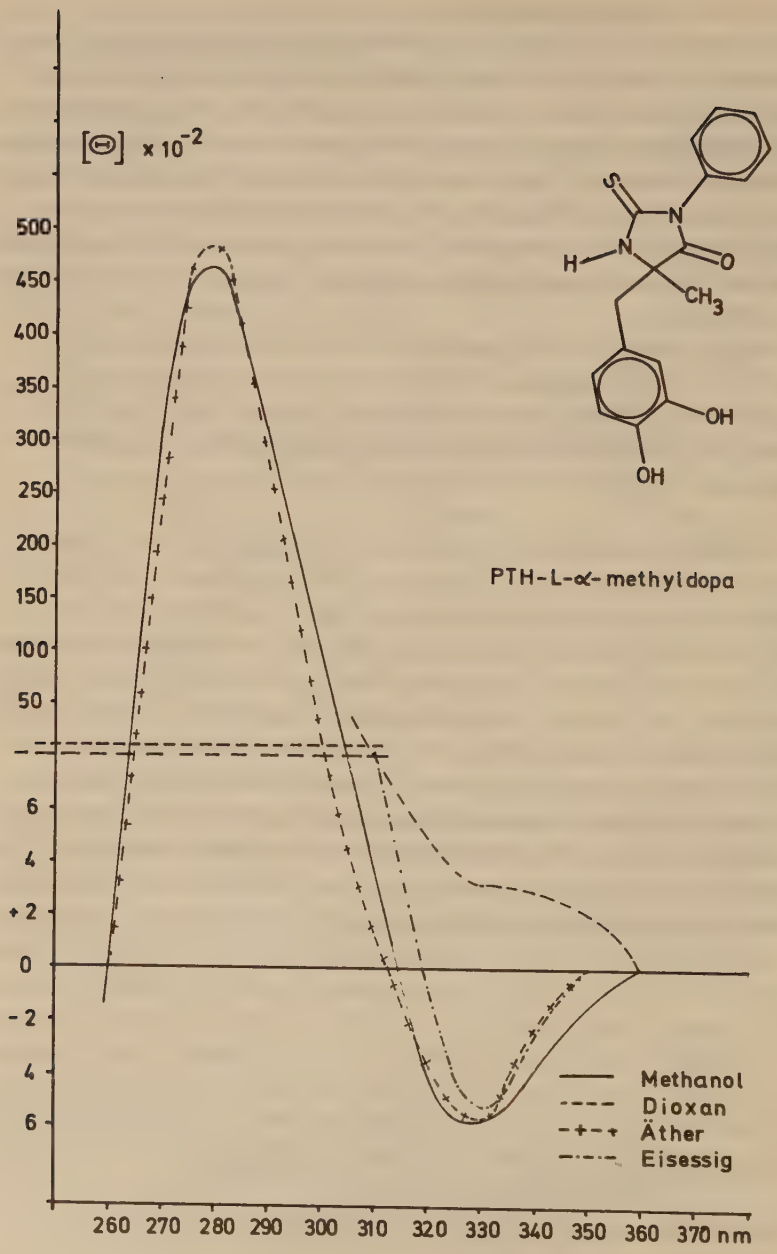
wurde auf Polyamid-DC-Platten untersucht, da auf Kieselgel und Aluminiumoxid starke Zersetzung beobachtet wurde. Eine geringe Verunreinigung am Startfleck wurde durch Säulenchromatographie über Polyamid entfernt. Es resultierte ein weißes Pulver, das dc einheitlich war. Da die Analysenwerte nicht befriedigend waren und kein scharfer Schmelzpunkt gefunden wurde, konnten wir die Identität der Substanz nur auf Grund des UV-Spektrums (max. 269 nm), des IR-Spektrums und der Molekulargewichtsbestimmung (massenspektrometrisch) feststellen.

Wegen besserer Handhabung haben wir nach H.Slates[51] 2-(3',4')-Dimethoxyphenyl-2-methylalanin dargestellt und dieses zum 3-Phenyl-2-thiohydantoin umgesetzt. Diese Substanz war aber ebenfalls nicht kristallin, so daß die Messungen mit dem ersten Produkt durchgeführt wurden.

Wie die anderen 3-Phenyl-2-thiohydantoine wurde das PTH-(-)-α-Methyldopa in Methanol, Dioxan, Äther und Eisessig im Dichrographen vermessen (Abb. S.52, Tabelle 3). Wie erwartet traten im Bereich der 320 nm UV-Bande negative Cotton-Effekte auf. Allerdings nur in Methanol, Äther und Eisessig. In Dioxan fiel ein schwach positiver CE auf; das war das erste Auftreten eines deutlichen Lösungsmitteleffektes. Im Bereich der 270 nm UV-Bande traten bei diesem Derivat in allen Lösungsmitteln zusätzlich äußerst starke positive CE auf. Möglicherweise ist der negative CE in Dioxan bei 320 nm so schwach, daß er von der starken positiven CD Kurve überdeckt wird.

---

51) H.L.Slates, D.Traub, C.H.Kuo, N.L.Wendler, J.org.Chemistry 29, 1424 (1966)


[Θ] x 10^-2
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
6
4
+2
0
-2
4
6
260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 nm
Methanol
Dioxan
Äther
Eisessig
PTH-L-α-methyldopa
S
N
H
N
O
CH3
OH
OH

2.3.4. Darstellung des α-Methylleucins, Trennung in die optischen Antipoden

α-Aminosäuren sind verhältnismäßig leicht synthetisch aus den entsprechenden Aldehyden, α-Methylaminosäuren aus den Ketonen zugänglich. Die 2-Amino-2,4-dimethyl-pentancarbonsäure I wurde erstens nach einer modifizierten Streckersynthese aus Methylisobutylketon II über das Aminonitril III in 60%iger Ausbeute dargestellt.

In einem zweiten Ansatz wurde nach einer auf Bucherer zurückgehenden Methode[52] aus Methylisobutylketon das Methylisobutylhydantoin IV dargestellt (70%) und dieses zur Aminosäure verseift (80%). Diese Methode hat den Vorteil der größeren Reinheit des Endproduktes, da das Hydantoin isoliert und umkristallisiert werden kann.

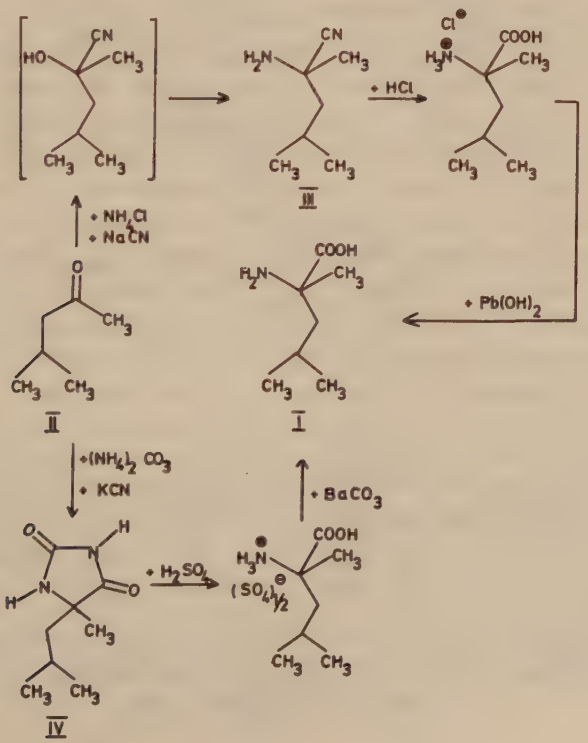


Abb.12

Der Weg der Racemattrennung der Aminosäure über diastereomere Salze von N-Acetyl-, N-Formyl- und N-Benzoyl-α-methylleucin mit Brucin, Chinin und Chinchonidin sowie (-)-α-Phenyläthylamin war nicht gangbar, weil entweder die Löslichkeit der Salze zu gut war oder aber beide Diastereomere zusammen kristallisierten. Bewährt hat sich die Methode von S.Terashima[53], dem es erstmals gelungen war, α-Methylaminosäuren über ihre l-Menthylester zu trennen.

Durch Erhitzen von N-Acetyl-α-methylleucin I mit Acetanhydrid wurde das 2,4-Dimethyl-4-isobutyl-2-oxazolin-5-on II erhalten. Dieses wurde mit Na-menthylat in Benzol zum Menthylester III umgesetzt.

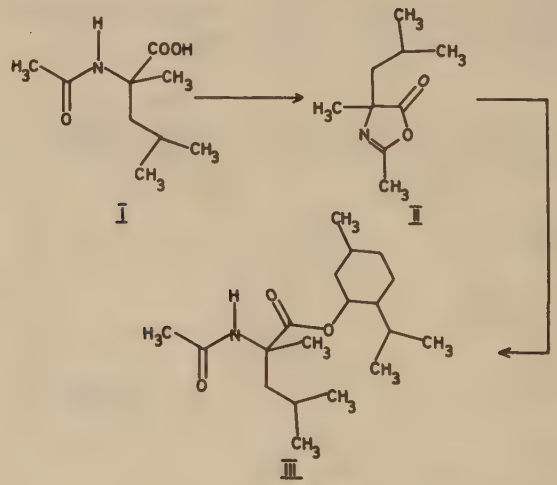


Abb.13

Die diastereomeren Menthylester wurden durch fraktionierte Kristallisation aus n-Hexan voneinander getrennt. Der schwerlösliche Ester konnte in sehr reiner Form gewonnen werden. Wegen zu guter Löslichkeit konnte das andere Dia-

---

52) H.Th.Bucherer, V.Lieb, J.prakt.Chem. 141, 5 (1934)

53) S.Terashima, K.Achiwa, S.Yamada, Chem.Pharmac.Bull. (Tokyo) 12, 1399 (1965)

stereomer nicht rein erhalten werden. Die Ester wurden mit alkoholischer KOH zur N-Acetylaminosäure verseift und diese durch Kochen mit HCl in die Aminosäure überführt. Die Chloridionen wurden über schwach basischem Anionenaustauscher entfernt.

Das aus dem schwerlöslichen Ester gewonnene α-Methylleucin zeigte eine negative spez. Drehung $[\alpha]_{546}^{20}$ -34° (Wasser). Der Antipode konnte nur in angereicherter Form isoliert werden, $[\alpha]_{546}^{20}$ +10°. α-Methylleucin ist erstmalig in optisch aktiver Form dargestellt worden.

2.3.5. Konfiguration und Cotton-Effekte des 3-Phenyl-2-thiohydantoins aus α-Methylleucin

(-)-α-Methylleucin zeigt in Wasser eine negative spez. Drehung $[\alpha]_{546}^{20}$ -34° und in 2 n HCl $[\alpha]_{546}^{20}$ -27°. Die Differenz $[M]_{Säure} - [M]_{H_2O}$ ist positiv und entspricht damit der Clough-Lutz-Jirgenson-Regel für L-Aminosäuren. Mit diesem Befund kann allerdings kein Beweis geführt werden, da bisher mangels optisch aktiver α-Methylaminosäuren nicht untersucht worden ist, ob die "Isovalin-Ausnahme" (siehe S.47) die einzige Ausnahme ist. (-)-α-Methyldopa widerspricht der Regel nicht.

Das CE Vorzeichen des 3-Phenyl-2-thiohydantoins aus (-)-α-Methylleucin sollte bei vorliegender L-Konfiguration negativ sein. Die CD Kurven (Abb. S.56) zeigen, daß tatsächlich in Methanol, Dioxan und Eisessig mittelstarke negative CE bei 320 nm auftreten. In Äther aber überraschenderweise ein schwach positiver CE. In Chloroform und Diisopropyläther sind die CE wieder negativ. Dieser zweite bei 3-Phenyl-2-thiohydantoinen aus α-Methylaminosäuren beobachtete Lösungsmitteleffekt macht die Erwartung zunichte, für α-Methylaminosäuren lägen die Verhältnisse so klar wie bei den α-Aminosäuren. Eine sichere Regel kann aus den bisherigen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Mit großer Wahrscheinlichkeit kann dem (-)-α-Methylleucin auf Grund negativer Vorzeichen der CE des 3-Phenyl-2-thiohydantoins in 5 von 6 benutzten Lösungsmitteln die L-Konfiguration zugeordnet werden.

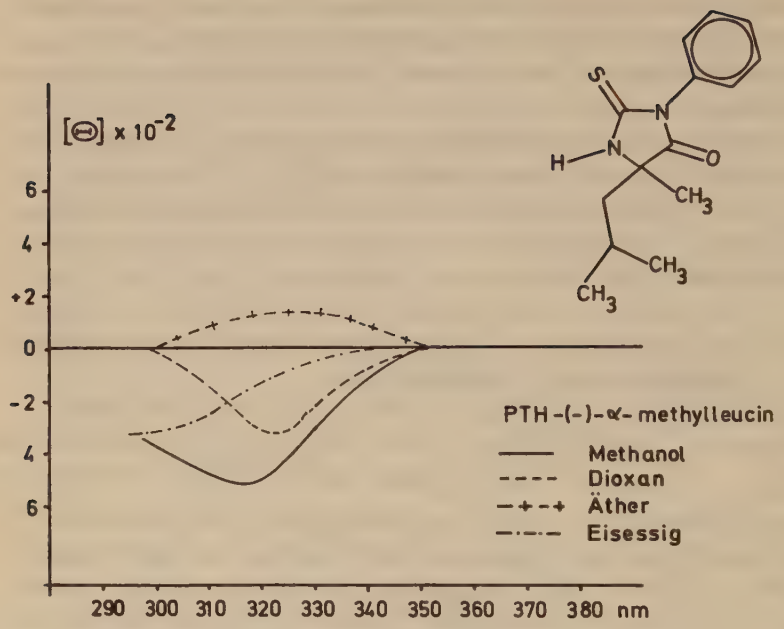


Abb.14

	Eisessig	Methanol	Dioxan	Äther
PTH-S-isovalin	-464_{325}	-395_{323}	-696_{325}	-507_{329}
PTH-R-isovalin	$+464_{325}$	$+395_{323}$	$+696_{325}$	$+507_{329}$
PTH-L-α-methyldopa	-524_{331}	-566_{327}	$+ca.400_{325}$	-568_{330}
PTH-L-α-methylleucin	-CE Max. nicht erreicht	-513_{317}	-324_{324}	$+135_{329}$

Tabelle 3: CD Maxima der 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus α-Methylaminosäuren

2.4. Erfahrungen mit anderen Chromophoren

Die schon sehr gut mit dem Circulardichroismus untersuchten N-Thiobenzoylderivate wurden nach der Methode von A.Kjaer[54] dargestellt. Eine Grignardlösung aus Brombenzol wurde mit Schwefelkohlenstoff umgesetzt. Nach Zugabe von Eis wurde zur wäßrigen Phase eine mit Na_2CO_3 neutralisierte Lösung von Monochloressigsäure gegeben und nach dem Ansäuern das zunächst ölige, dann kristalline Carboxymethyldithiobenzoat erhalten. Mit dieser Verbindung wurde dann die Aminosäure im Alkalischen umgesetzt und nach dem Ansäuern das N-Thiobenzoylderivat als gelbes Öl und nur selten kristallin erhalten.

Versuche, die Darstellung zu reproduzieren, verliefen wenig erfolgreich. Es sollten die N-Phenylthioacetylderivate nach der gleichen Methode wie oben[55] synthetisiert werden. Schon die Darstellung reinen Carboxymethyldithiophenylacetats war schwierig. Der Lit.-Schmp. 79° wurde nie erreicht. Die Synthese der Aminosäurederivate daraus gelang nicht.

Die entsprechenden Benzoyl- und Phenylacetylderivate wurden aus den Säurechloriden mit L-Alanin im Alkalischen dargestellt. Sie eignen sich nicht als chromophore Derivate, da der n-π^* Übergang der Carbonylgruppe in Säureamiden zu Wellenlängen um 230 nm verschoben wird. Die bei 257 nm erscheinende strukturierte UV-Absorptionsbande des Benzolchromophors ist zu intensiv, als daß mit den gebräuchlichen Geräten geklärt werden könnte, ob diese Bande optisch aktiv ist.

2.5. Vergleich der verschiedenen Chromophore, Diskussion

Von der Darstellung her fällt ein Vergleich der chromophoren Derivate zugunsten der N-Phthalylaminosäuren aus. Es sind kristalline Verbindungen, die während der Darstellung nicht racemisieren. Problemlos ist auch die Darstellung der 3-Phenyl-2-thiohydantoine, nur ist hier die Gefahr der Racemisierung groß. Wie gezeigt wurde, läßt sich diese durch

---

54) A.Kjaer, Acta chem.Scand. 4, 1347 (1950)
55) " " " " 6, 327 (1952)

mildere Reaktionsbedingungen vermeiden, wenn auch nicht mit Sicherheit.

Die Darstellung der Thiobenzoyl-, Phenylthioacetylderivate und Dithiocarbamate ist langwierig, führt aber meist zu optisch aktiven Derivaten. Über Lösungsmitteleffekte ist genügend bekannt.

Die CD Spektren der N-Phthalylaminosäuren sind kompliziert und schwer zu interpretieren. Die CE haben nicht bei allen Derivaten gleiche Vorzeichen,und sie lassen sich keiner sichtbaren UV-Bande zuordnen. Zudem treten starke Lösungsmitteleffekte wie bei anderen offenkettigen Derivaten auf. Es kann gesagt werden, daß sich auch die N-Phthalylderivate ebenso wie die Dithiocarbamate, N-Thiobenzoyl- und Phenylthioacetylderivate wenig zur Konfigurationsbestimmung eignen. Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann die Konfiguration nicht untersuchter N-Phthalylaminosäuren nur mit Vorbehalt aus dem Vorzeichen des CE vorhergesagt werden. Rotationsisomere und Solvatation führen zu komplizierten CD Spektren.

3-Phenyl-2-thiohydantoine dagegen zeigen einfache CD Kurven. Die CE lassen sich einer optisch aktiven Schulter der UV-Kurve zuordnen. Wegen ihrer cyclischen Struktur sind sie ideale chromophore Derivate, bei denen keine bemerkenswerten Lösungsmitteleffekte auftreten. Das Vorzeichen der CE läßt sich mit der absoluten Konfiguration in Übereinstimmung bringen.

Im Unterschied zu den α-Aminosäuren treten bei den 3-Phenyl-2-thiohydantoinen aus α-Methylaminosäuren wieder Lösungsmitteleffekte auf.

Der Umweg über chromophore Derivate, um den Circulardichroismus der Aminosäuren zu messen und evtl. aus dem Vorzeichen des CE die Konfiguration zu bestimmen, bleibt ein Kompromiß, den man einschlagen muß, um vorhandene Geräte ausnutzen zu können. Ins tiefe UV (unter 220 nm) reichende Dichrographen, mit denen man den Carboxylchromophor der Aminosäuren messen kann, sind ungewöhnlich teuer und zur Zeit nur wenig verbreitet. Dennoch sind schon viele α-Aminosäuren direkt ver-

messen worden[56]. Es scheint, daß sich das Vorzeichen des CE der optisch aktiven Absorptionsbande der Carboxylgruppe von α-Aminosäuren der Konfiguration zuordnen läßt.

---

56) L.I.Katzin, E.Gulyas, J.Amer.chem.Soc. 90, 247 (1968)

2.6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Überblick über N-Acylderivate von Aminosäuren gegeben, die zur Messung des Circulardichroismus benutzt werden können. Das Schwergewicht lag dabei auf den Derivaten, die bezüglich der praktischen Anwendung am geeignetsten erscheinen, den N-Phthalylaminosäuren und den 3-Phenyl-2-thiohydantoinen.

Die Darstellung von fünfzehn optisch aktiven N-Phthalyl-α-aminosäuren wurde beschrieben und ihr Verhalten im Dichrographen in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Konfiguration von N-Phthalylaminosäuren nur mit Vorbehalt aus dem Vorzeichen des Cotton-Effektes vorhergesagt werden kann. Die freie Drehbarkeit der Substituenten am asymmetrischen C, vor allem um die C-N-Bindung, ermöglicht mehrere Rotationsisomere, die in von Lösungsmittel und Temperatur bestimmten Gleichgewichten vorliegen. Zusätzlich muß die Solvatation der Moleküle in Betracht gezogen werden. Häufig auftretende Doppelkurven erschweren die Interpretation der erhaltenen Spektren.

Ferner wurde die Darstellung von siebzehn optisch aktiven 3-Phenyl-2-thiohydantoinen aus L- und D-Aminosäuren beschrieben. Ihr Verhalten im Dichrographen in verschiedenen Lösungsmitteln wurde untersucht und dabei festgestellt, daß sich die circulardichroitischen Kurven einer optisch aktiven Absorptionsbande des UV-Spektrums zuordnen lassen. Die Vorzeichen der Cotton-Effekte waren für alle Derivate einer Konfiguration in allen verwendeten Lösungsmitteln gleich, so daß positive Cotton-Effekte der L-Konfiguration, negative Cotton-Effekte der D-Konfiguration entsprechen.

In die Untersuchung einbezogen wurden die α-Methylaminosäuren (+)-Isovalin und (-)-α-Methyldopa, deren Konfiguration bekannt ist, und das in optisch aktiver Form bisher nicht dargestellte α-Methylleucin.

R,S-Isovalin wurde in seine Enantiomere getrennt. Die Darstellung des α-Methylleucins und seiner optischen Antipoden wurde beschrieben. In reiner Form konnte die linksdrehende Form des α-Methylleucins gewonnen werden.

Die 3-Phenyl-2-thiohydantoine aus S-(+)-Isovalin, R-(-)-Isovalin, L-(-)-α-Methyldopa und (-)-α-Methylleucin wurden dargestellt und in verschiedenen Lösungsmitteln im Dichrographen vermessen. Für die L- bzw. S-Derivate traten im Bereich der 320 nm Bande in den meisten Lösungsmitteln negative Cotton-Effekte auf. Im Unterschied zu den 3-Phenyl-2-thiohydantoinen aus α-Aminosäuren wurden aber bei den α-Methylaminosäurederivaten lösungsmittelbedingte Vorzeichenumkehrungen beobachtet, so daß eine allgemeingültige Regel nicht aufgestellt werden konnte.

Aus diesem Grunde können die negativen Cotton-Effekte des 3-Phenyl-2-thiohydantoins aus (-)-α-Methylleucin in fünf von sechs benutzten Lösungsmitteln nur als Hinweis, nicht aber als Bestätigung für das Vorliegen der L- bzw. S-Konfiguration gewertet werden.

3. Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Reichert Heiztischmikroskop nach Kofler bestimmt. Sie sind nicht korrigiert.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden mit einem HERAEUS-Mikro-R-Verbrennungsgerät durchgeführt.

Optische Drehung

Die optische Drehung wurde mit einem LEITZ E-Polarimeter (Prototyp) und einem ZEISS Kreispolarimeter $0{,}01^{\circ}$ in 100 mm Röhren gemessen.

Ultraviolett-Absorptionsspektren

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem ZEISS Spektralphotometer PMQ II in Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke aufgenommen.

Circulardichroitische Spektren

Die CD Spektren wurden mit einem modifizierten Dichrographen der Firma ROUSSEL-JOUAN/Paris, Baujahr 1964, aufgenommen. Spektralbereich 600 - 220 nm, Empfindlichkeit $1{,}5/2/3\ 10^{-4}$. Es wurden Stahlküvetten mit 20 mm Schichtdicke verwendet. Lösungsmittel: Merck Uvasole.

Berechnung der molaren Elliptizität:

$$[\Theta] = \frac{3300 \times d \times s \times \text{Mol.Gew.} \times 10^{-4}}{l \times c}$$

d = Auslenkung des Schreibers aus der Nullinie in mm

s = Empfindlichkeit 1,5

Θ = Dämpfung 2

l = Schichtdicke in cm

c = Konzentration in g/l

Dünnschichtchromatographie

Die DC-Analysen wurden mit der Desaga-Grundausrüstung auf Trägerplatten der Größe 20 x 20 cm durchgeführt. Sorptionsmittel: Kieselgel G und Polyamid der Firma Merck. Aktivierung der beschichteten Platten 1 Std. bei 110°. Detektion: Jodkammer, Dragendorffs-Reagens, Ninhydrin-Spray.

Infrarot-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem BECKMAN Spektrophotometer IR 8 in KBr-Preßlingen oder $CHCl_3$-Lösung gemessen.

N-Phthalyl-α-aminosäuren (siehe Tabelle S. 70)

Allgemeine Vorschrift A[27]:

0,01 Mol L-Aminosäure wurde durch längeres Kochen mit 0,015 Mol Phthalsäureanhydrid in 20 ml Eisessig zu der entsprechenden N-Phthalyl-L-aminosäure umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer stark eingeengt, mit 50 ml Wasser verdünnt und zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen kristallisierte das Produkt aus. Die Derivate wurden aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert.

Allgemeine Vorschrift B[26]:

0,01 Mol L-Aminosäure wurde mit 0,011 Mol Phthalsäureanhydrid unter Rühren bei 140 - 150° im Ölbad zusammengeschmolzen, bis eine klare Lösung entstanden war. Nach dem Abkühlen wurde aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert.

Allgemeine Vorschrift C[28]:

0,01 Mol L-Aminosäure wurden mit 0,011 Mol Phthalsäureanhydrid fein verrieben und unter Rühren in 15 ml Dioxan ca. 5 Std. auf 105° erhitzt. Das Dioxan wurde nach beendeter Reaktion am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit Chloroform zum Sieden erhitzt und abfiltriert. Nach dem Einengen des Chloroforms kristallisierte das Produkt aus.

Allgemeine Vorschrift D[29]:

0,01 Mol Aminosäure und 0,01 Mol $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ wurden in 25 ml H_2O gelöst und 0,011 Mol N-Carboäthoxyphthalimid hinzugegeben. Die Mischung wurde weitergerührt, bis eine klare

Lösung entstanden war (10 - 15 Min.). Anschließend wurde filtriert und das Filtrat mit 6 n HCl bis pH 2 angesäuert. Die ausgefallenen N-Phthalylaminosäuren wurden durch Erhitzen gelöst. Beim Abkühlen sollte das reine Produkt, das dann umkristallisiert werden müßte, ausfallen. Fiel beim Ansäuern nichts aus, so wurde die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit trockenem Aceton extrahiert. Das Aceton wurde abgezogen und der Rückstand aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert.

Die Reaktionen nach A, C und D ergaben immer optisch reine Produkte. Bei der Methode B sollte die Ölbadtemperatur nicht über 180° steigen, um Racemisierung zu vermeiden. Der große Vorteil der Methode D ist die Reaktionstemperatur von 20°. Somit können auch leicht zersetzliche Aminosäuren dargestellt werden. So wurden z.B. Serin und Cystin umgesetzt. Bisher nicht gelungen ist die Darstellung des N-Phthalyl-L-tryptophans.

N-Phthalyl-L-alanin Mol.-Gew. 219,2

0,89 g L-Alanin wurden mit 2,5 g Phthalsäureanhydrid in 20 ml Eisessig 5 Std. lang am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Verdünnen mit 100 ml Wasser wurde 3 mal mit Chloroform extrahiert, der Extrakt getrocknet und abgedampft. Der Rückstand wurde aus Äther/Ligroin 1:1 umkristallisiert.

Ausbeute 2,2 g = 59,6 %

Schmp. 144-145° (Lit. 150-151°)[57] $[\alpha]_{546}^{21}$ -32° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-D-alanin

0,5 g D-Alanin ergaben eine Ausbeute von 0,7 g = 58 %

Schmp. 145-146° $[\alpha]_{546}^{22}$ +31° (c=2, Methanol)

CD Messung c = 3

---

57) E.Fischer, Chem.Ber. 40, 489 (1907)

N-Phthalyl-L-valin Mol.-Gew. 247,3

0,58 g L-Valin wurden 30 Min. lang mit 0,7 g Phthalsäureanhydrid bei 150° im Ölbad zusammengeschmolzen. Die abgekühlte Schmelze wurde aus 8 %iger Essigsäure umkristallisiert.

Ausbeute 0,68 g = 56,2 %

Schmp. 118-119° (Lit. 114-115°)[26c] $[\alpha]_{546}^{22}$ -79° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-D-valin

Aus 0,58 g D-Valin wurden 0,72 g = 59,5 % erhalten.

Schmp. 118° $[\alpha]_{546}^{22}$ +79° (c=2, Methanol)

N-Phthalyl-L-leucin Mol.-Gew. 261,3

1,3 g L-Leucin wurden mit 2,2 g Phthalsäureanhydrid in 20 ml Eisessig 5 Std. am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abziehen des größten Teils des Eisessigs wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und erhitzt. Die beim Abkühlen ausgefallenen Kristalle wurden aus 10 %iger Essigsäure umkristallisiert.

Ausbeute 2,1 g = 80,8 %, Nadeln.

Schmp. 121° (Lit. 118-119,5°)[26] $[\alpha]_{546}^{21}$ -24° (c= 2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-D-leucin

1,3 g D-Leucin ergaben eine Ausbeute von 2,0 g = 77 %

Schmp. 122° $[\alpha]_{546}^{21}$ +24° (c=2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-L-isoleucin Mol.-Gew. 261,3

1,3 g L-Isoleucin wurden mit 2,2 g Phthalsäureanhydrid in 20 ml Eisessig 5 Std. zum Sieden erhitzt. Nach dem Abziehen des Eisessigs wurde mit 100 ml Wasser aufgekocht. Beim Abkühlen blieb jedoch stets ein Öl zurück, das aus Äther/Ligroin rechteckige Kristallplättchen ergab.

Ausbeute 1,8 g = 69,3%

Schmp. 125° (Lit. 120-121°)[26d] $[\alpha]_{546}^{21}$ -53° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-L-serin

1,05 g L-Serin wurden mit 2,86 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ in 15 ml H_2O gelöst. Nach Zugabe von 2,2 g N-Carboäthoxyphthalimid wurde gerührt, bis fast alles in Lösung gegangen war (15 Min.), und abfiltriert. Nach dem Ansäuern mit 6 n HCl fiel nichts aus, so daß die Lösung zur Trockne eingeengt wurde und der Rückstand nach Trocknen im Exsikkator mit heißem Chloroform extrahiert wurde. Der Extrakt wurde eingeengt und gekühlt. Nach 24 Std. im Eisschrank bei 0° wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 1,9 g = 79%

Schmp. 135-136° (Lit. 152°)[29] $[\alpha]_{546}^{20}$ -50° (c=1,Methanol)

$C_{11}H_9NO_5$ Ber.: C 56,17 H 3,86 N 5,96 Mol.-Gew. 235,2
Gef.: C 55,9 H 4,0 N 5,84 " " 233 (osmometr.)

CD Messung c = 1,5

N-Phthalyl-L-threonin Mol.-Gew. 249,2

1,52 g L-Threonin wurden mit 2,3 g Phthalsäureanhydrid in 15 ml trockenem Dioxan 10 Std. lang am Rückfluß erhitzt und gerührt. Danach enthielt die gelbe Lösung immer noch einen Bodensatz. Es wurde abgedampft, mit Chloroform heiß extrahiert und das Filtrat eingeengt. Nach längerem Stehen im Eisschrank wurden große pyramidenförmige Kristalle erhalten. Ausbeute 1,5 g = 48,5 %

Schmp. 139-140° (Lit. 135-140°)[28] $[\alpha]_{546}^{23}$ -33° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 1,5

N-Phthalyl-L-methionin Mol.-Gew. 279,3

1,4 g L-Methionin und 1,5 g Phthalsäureanhydrid wurden bei 150° im Ölbad 20 Min. zusammengeschmolzen. Die Schmelze wurde in wenig Methanol gelöst und mit 50 ml Wasser verdünnt. Nach dem Abkühlen resultierte ein gelbliches Öl, das nach 2 Tagen fest wurde. Es wurde aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 2 g = 77 %

Schmp. 124° (Lit. 124°)[58] $[\alpha]_{546}^{23}$ -55° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 3

---

58) S.Guttmann, R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 41,1852(1958)

N-Phthalyl-L-glutaminsäure Mol.-Gew. 277,2

2,94 g L-Glutaminsäure wurden mit 6 g Phthalsäureanhydrid in 25 ml Eisessig 8 Std. lang zum Sieden erhitzt. Danach wurde mit 200 ml Wasser verdünnt und aufgekocht. Beim Abkühlen schied sich zunächst ein Öl ab, das nach 24 Std. im Eisschrank fest wurde. Umkristallisiert wurde aus 8 %iger Essigsäure. Ausbeute 2,25 g = 40 %

Schmp. 160-162°(Lit. 158-159°)[59] $[\alpha]_{546}^{22}$ -44° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-L-glutamin Mol.-Gew. 276,3

1,46 g L-Glutamin wurden mit 2,86 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ in 30 ml Wasser gelöst. Nachdem 2,2 g N-Carboäthoxyphthalimid hinzugegeben worden waren, wurde gerührt, bis fast alles gelöst war (20 Min.), und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde mit 6 n HCl angesäuert und zur Trockne eingedampft. Der im Exsikkator getrocknete Rückstand wurde mit getrocknetem Aceton extrahiert. Versuche, aus dem eingeengten Extrakt durch Kristallisation ein reines Produkt zu erhalten, mißlangen. So wurde durch präparative DC auf Kieselgel HF (Fließmittel: Benzol 60, Methanol 20, Eisessig 6,5) zunächst 20 mg N-Phthalyl-L-glutamin gewonnen. Diese Menge reichte gerade für eine CD Messung.

N-Phthalyl-L-phenylalanin Mol.-Gew. 295,3

1,65 g L-Phenylalanin und 1,5 g Phthalsäureanhydrid wurden 30 Min. lang bei 160° im Ölbad zusammengeschmolzen. Die abgekühlte Schmelze wurde zweimal aus 15 %iger Essigsäure umkristallisiert. Ausbeute 2,35 g = 80 % (Nadeln)

Schmp. 182-183° (Lit. 182°)[27] $[\alpha]_{546}^{22}$ -242° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 1,5

---

59) F.E.King, D.A.A.Kidd, J.chem.Soc. 1949, 3315

N-Phthalyl-L-tyrosin

1,81 g L-Tyrosin wurden mit 4 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ in 30 ml Wasser gelöst. Nachdem 2,2 g N-Carboäthoxyphthalimid hinzugegeben worden waren, wurde 30 Min. gerührt. Es wurde vom Ungelösten abfiltriert und die gelbliche Lösung mit konz. HCl angesäuert. Der voluminöse Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Aus verd. Essigsäure wurde umkristallisiert. Ausbeute 1,8 g = 58 % (Plättchen)

Schmp. 163° $[\alpha]_{546}^{22}$ -180° (c = 2, Methanol)

$C_{17}H_{13}NO_5$ (311,3) Ber.: C 65,6 H 4,2 N 4,5

$\cdot 1\ H_2O$ Ber.: C 62,00 H 4,59 N 4,25

Gef.: C 62,04 H 4,6 N 4,2

Die Substanz enthält genau 1 Mol Kristallwasser. Nach 48 Std. im Hochvakuum über P_2O_5 bei 60° wurde für das wasserfreie Produkt ein Schmelzpunkt von 192° gefunden.

CD Messung c = 3

N-Phthalyl-L-histidin Mol.-Gew. 285,3

1,55 g L-Histidin wurden mit 5,7 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ in 30 ml Wasser gelöst. Nach Hinzufügen von 2,5 g N-Carboäthoxyphthalimid wurde 40 Min. gerührt und die fast klare Lösung filtriert. Nach dem Ansäuern mit 6 n HCl fiel nichts aus. Es wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand im Exsikkator über Blaugel und NaOH-Rotuli getrocknet. Danach wurde das N-Phthalyl-L-histidinhydrochlorid mit absolutem Äthanol extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde mit Diäthylamin neutralisiert und gekühlt. Da nur sehr wenig ausfiel, wurde eingeengt und aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 2,1 g = 73 %

Schmp. 294-296° (Lit. 296°)[29] $[\alpha]_{546}^{20}$ -170° (c = 1, Methanol)

CD Messung c = 3

N,N-Diphthalyl-L-lysin

1,83 g L-Lysinmonohydrochlorid wurde mit 4,5 g Phthalsäureanhydrid und 1 g Natriumacetat in 30 ml Eisessig 8 Std. zum Sieden erhitzt. Nach dem Verdünnen mit Wasser fiel das Produkt ölig an. Es wurde nach dem Abtrennen im Exsikkator

getrocknet. Aus Äther wurde ein weißes Pulver erhalten.
Ausbeute 2,8 g = 69 %
Schmp. 98-103° $[\alpha]_{546}^{20}$ -48° (c = 1, Methanol)
CD Messung c = 3

$C_{22}H_{18}N_2O_6$ (406,4) Ber.: C 65,02 H 4,46 N 6,89
Gef.: C 64,8 H 4,6 N 6,7
Gef.: Mol.-Gew. 401 (osmometr.)

N,N-Diphthalyl-L-cystin

2,4 g L-Cystin und 5,72 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ wurden in 40 ml Wasser gelöst und 4,5 g N-Carboäthoxyphthalimid hinzugegeben. Nach 30 Min. Rühren wurde die fast klare Lösung filtriert und mit 6 n HCl angesäuert. Der voluminöse Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Zur Reinigung wurde mehrmals in Methanol gelöst und durch Einrühren in kaltes Wasser wieder ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und sorgfältig im Exsikkator getrocknet.
Ausbeute 3,26 g = 65 %
Schmp. 118-121° (Lit. 120°)[29] $[\alpha]_{546}^{20}$ -275° (c = 1, Methanol)
CD Messung c = 3

$C_{22}H_{16}N_2O_8S_2$ Ber.: C 52,81 H 3,22 N 5,60 Mol.-Gew. 500,3
Gef.: C 52,4 H 3,6 N 5,35 " " 491 (osmometr.)

- - - - - - - - - - - - - -

Die Reinheit der N-Phthalylderivate wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel HF überprüft.
Fließmittel: Ameisensäureäthylester 24, Ameisensäure 1, Chloroform 25, Benzol 30.
Detektion mit Dragendorffs-Reagens.

	Schmp.	Methode	spez.Drehung
N-Phthalyl-L-alanin	144-145°	A 5 Std.	$[\alpha]_{546}^{21}$ - 32° c=2, Methanol
" -D-alanin	145-146°	A 5 Std.	$[\alpha]_{546}^{22}$ + 31° c=2, "
" -L-valin	118-119°	B 30 Min.	$[\alpha]_{546}^{22}$ - 79° c=2, "
" -D-valin	118°	B 30 Min.	$[\alpha]_{546}^{22}$ + 79° c=2, "
" -L-leucin	121°	A 5 Std.	$[\alpha]_{546}^{21}$ - 24° c=2, "
" -D-leucin	122°	A 5 Std.	$[\alpha]_{546}^{21}$ + 24° c=2, "
" -L-isoleucin	125°	A 5 Std.	$[\alpha]_{546}^{21}$ - 53° c=2, "
" -L-serin	135-136°	D 20 Min.	$[\alpha]_{546}^{20}$ - 50° c=1, "
" -L-threonin	139-140°	C 7 Std.	$[\alpha]_{546}^{23}$ - 33° c=2, "
" -L-methionin	124°	B 20 Min.	$[\alpha]_{546}^{23}$ - 55° c=2, "
" -L-glutaminsäure	160-162°	A 8 Std.	$[\alpha]_{546}^{22}$ - 44° c=2, "
" -L-phenylalanin	182-183°	B 30 Min.	$[\alpha]_{546}^{22}$ -242° c=2, "
" -L-tyrosin	163°/192°	D 30 Min.	$[\alpha]_{546}^{22}$ -180° c=2, "
" -L-histidin	294-296°	D 40 Min.	$[\alpha]_{546}^{20}$ -170° c=1, "
N,N-Diphthalyl-L-lysin	98-103°	A 8 Std.	$[\alpha]_{546}^{20}$ - 48° c=1, "
" -L-cystin	118-121°	D 30 Min.	$[\alpha]_{546}^{20}$ -275° c=1, "

Tabelle 4 : N-Phthalylderivate

3-Phenyl-2-thiohydantoine (siehe Tabelle S.77)

Allgemeine Vorschrift:

500 mg Aminosäure wurden in 6 ml Pyridin und 6 ml Wasser suspendiert und der pH auf 8 - 8,5 mit 0,5 n NaOH eingestellt (Indikatorpapier). Es wurde gerührt, bis alles gelöst war und dann 0,6 ml Phenylisothiocyanat hinzugegeben. Die Temperatur der Lösung wurde auf 20° gehalten. Unter successivem NaOH-Zusatz (pH 8 - 8,5) wurde 30 Min. gerührt. Anschließend wurde die gelbliche Lösung 2 mal mit Benzol extrahiert und mit konz. HCl angesäuert (pH 1 - 2). Nach kurzem Erhitzen und Einengen im Vakuum fielen die meisten Produkte aus. Sie wurden aus verd. Methanol umkristallisiert.

- - - - - - - - - - -

L-5-Methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Alanin)

Nach der allgemeinen Vorschrift. Beim Ansäuern fiel das Derivat aus. Es wurde aus 70 %igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute 550 mg = 48 %

Schmp. 182-184° (Lit. 185°)[25] $[\alpha]_{546}^{25}$ -17° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 1

$C_{10}H_{10}N_2OS$ (206,3) Ber.: C 58,25 H 4,89 N 13,58 S 15,5

Gef.: C 58,35 H 4,75 N 13,3 S 15,6

D-5-Methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus D-Alanin)

Ausbeute 580 mg = 50 %

Schmp. 181-183° $[\alpha]_{546}^{25}$ +50° (c = 1, Methanol)

CD Messung c = 1

L-5-Isopropyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Valin)

Mol.-Gew. 234,3

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde aus 70 %igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute 530 mg = 53 %

Schmp. 208-209° (Lit. 206°)[25] $[\alpha]_{546}^{22}$ -46,5° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 1

L-5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Leucin)

Mol.-Gew. 248,4

1,31 g L-Leucin wurden in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 20 ml Dimethylformamid unter gelindem Erwärmen gelöst. Darauf wurde der pH auf 8 - 8,5 mit 0,2 n NaOH eingestellt. Nach Kühlung auf 8° wurden 2,5 ml Phenylisothiocyanat zugesetzt und die Mischung kräftig gerührt. Der pH wurde durch laufenden NaOH-Zusatz auf 8,5 gehalten. Da die Umsetzung langsam voranging, wurde auf 15° erwärmt. Nach 45 Min. wurde die gelbliche Lösung 2 mal mit Benzol extrahiert und mit 6 n HCl angesäuert. Es wurde unter vermindertem Druck eingedampft und der sirupähnliche Rückstand mit 50 ml 2 n HCl 1/2 Std. am Rückfluß erhitzt. Das gebildete Thiohydantoin wurde abgesaugt, getrocknet und aus 90 %igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 1,2 g = 49 % (verfilzte Nadeln)

Schmp. 181° (Lit. 176° rac.)[25] $[\alpha]_{546}^{22}$ -71° (c = 1,5 Methanol)

CD Messung c = 1

D-5-Isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus D-Leucin)

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde aus 90 %igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 550 mg = 58 %

Schmp. 179-180° $[\alpha]_{546}^{25}$ +54° (c = 2, Methanol)

CD Messung c = 1

L-5-sek.Butyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Isoleucin)

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde aus 70 %igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute 400 mg = 42,5 %

Schmp. 175-177° (Lit. 178°)[25] $[\alpha]_{546}^{22}$ -32° (c = 1,5 Methanol)

CD Messung c = 1

L-5-Hydroxymethyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Serin)
Mol.-Gew. 206,3

Nach der allgemeinen Vorschrift. Nach dem Ansäuern fiel nichts aus. Es wurde 24 Std. im Dunkeln stehen gelassen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Die Substanz zersetzte sich beim Umkristallisieren und am Licht.

Ausbeute 510 mg = 44 %

Schmp. 176-178° (Lit. 176-178°)[35]

Die spez. Drehung wurde wegen teilweiser Zersetzung nicht gemessen.

CD Messung c = 0,16

L-5-Hydroxyäthyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Threonin)

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde weder erwärmt noch eingeengt. Der Niederschlag wurde aus 90 %igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute 600 mg = 65 % (Nadeln)

Schmp. 195° (Zersetzung) (Lit. 194°)[35]

$[\alpha]_{546}^{24}$ -106° (c = 1,5, Methanol)

CD Messung c = 1

$C_{11}H_{12}N_2O_2S$ (220,2) Ber.: C 59,93 H 5,12 N 11,86 S 13,5
Gef.: C 59,7 H 5,2 N 11,4 S 13,3

L-1,5-Cyclotrimethylen-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Prolin)

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde aus 90 %igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute 350 mg = 36 %

Schmp. 177° (Lit. 179°)[25] $[\alpha]_{546}^{32}$ -62° (c=2, Methanol)

CD Messung c = 1

$C_{12}H_{12}N_2OS$ (232,2) Ber.: C 62,06 H 5,21 N 12,06 S 13,78
Gef.: C 61,9 H 5,15 N 11,8 S 13,82

L-5,2'-Methylmercaptoäthyl-3-phenyl-2-thiohydantoin
(aus L-Methionin) Mol.-Gew. 234,3

Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus.

Es wurde aus 70 %igem Methanol umkristallisiert.
Ausbeute 600 mg = 60 %
Schmp. 123-125° (Lit. 132°)[25] $[\alpha]_{546}^{22}$ -7° (c = 1,5, Methanol)

CD Messung c = 1

L-3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinacetamid (aus L-Asparagin)
Mol.-Gew. 249,2

Nach der allgemeinen Vorschrift. Beim Ansäuern fiel nichts aus. Nach 6 Std. Stehen unter Lichtausschluß fiel ein kristalliner Niederschlag, der aus absolutem Methanol umkristallisiert wurde.
Ausbeute 620 mg = 66 %
Schmp. 232° (Zersetzung) (Lit. 234°)[25]
$[\alpha]_{546}^{24}$ -106° (c = 1,5, Methanol + Chloroform 1 + 1)

CD Messung c = 1

L-3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinessigsäure (aus L-Asparaginsäure) Mol.-Gew. 250,2

Nach der allgemeinen Vorschrift. Beim Ansäuern fiel nichts aus. Nach 24 Std. im Dunkeln wurden Kristalle erhalten, die aus 70 %igem Methanol umkristallisiert wurden.
Ausbeute 250 mg = 26,5 %
Schmp. 227-230° (Lit. 229°)[25] $[\alpha]_{546}^{24}$ -27° (c = 1,5, Methanol)

CD Messung c = 1

L-3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinpropionamid (aus L-Glutamin)
Mol.-Gew. 263,3

Nach der allgemeinen Vorschrift. Beim Ansäuern fiel nichts aus. Nach 24 Std. bei Raumtemperatur Kristalle. Es wurde aus absolutem Methanol umkristallisiert.
Ausbeute 800 mg = 89 %
Schmp. 198-205° (Lit. 218°)[60] $[\alpha]_{546}^{25}$ -65° (c = 1, Methanol + Chloroform 1 + 1)

CD Messung c = 1

L-3-Phenyl-2-thio-5-hydantoinpropionsäure (aus L-Glutaminsäure) Mol.-Gew. 264,3

Wie bei L-Asparaginsäure.
Ausbeute 260 mg = 29 %
Schmp. 166-168° (Lit. 166-167°)[25] $[\alpha]_{546}^{25}$ -23° (c = 1, Methanol)

CD Messung c = 1

L-5-Benzyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Phenylalanin)
Nach der allgemeinen Vorschrift. Das Produkt fiel beim Ansäuern und anschließendem Erwärmen aus. Es wurde aus 90 %igem Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute 640 mg = 75 % (Nadeln)
Schmp. 187° (Lit. 187°)[25] $[\alpha]_{546}^{23}$ -42° (c = 1,5, Methanol)

CD Messung c = 1
$C_{16}H_{14}N_2OS$ (282,4) Ber.: C 68,07 H 5,02 N 9,92 S 11,4
Gef.: C 68,1 H 4,95 N 9,72 S 11,8

L-5-p-Hydroxybenzyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Tyrosin)
Nach der allgemeinen Vorschrift. Fiel beim Ansäuern aus. Es wurde aus 90 %igem Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute 560 mg = 85,5 % (Nadeln)
Schmp. 207-210° (Lit. 216°)[25] $[\alpha]_{546}^{23}$ -51° (c = 1,5, Methanol)

CD Messung c = 0,5
$C_{16}H_{14}N_2O_2S$ (298,3) Ber.: C 64,42 H 4,73 N 9,39 S 14,2
Gef.: C 64,5 H 4,83 N 8,73 S 12,86

L-5,4'-Phenylthioureidobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin (aus L-Lysin)
500 mg L-Lysinmonohydrochlorid wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 1,1 ml Phenylisothiocyanat umgesetzt. Nach dem Ansäuern fiel ein amorpher Niederschlag aus, der aus 70 %igem Methanol kristallin erhalten wurde.
Ausbeute 760 mg = 69,5 %

---

60) L.K.Ramachandran, A.Epp, W.B.McConnell, Analytic.Chem. 27, 1734 (1955)

Schmp. 154-155° (Lit. 162°)[25]

$[\alpha]_{546}^{24}$ -32° (c = 1, Methanol)

CD Messung c = 0,25

$C_{20}H_{22}N_4OS_2$ (398,5) Ber.: C 60,23 H 5,53 N 14,07 S 16,09

Gef.: C 59,8 H 5,56 N 13,4 S 15,3

- - - - - - - - - - -

Die Reinheit der 3-Phenyl-2-thiohydantoine wurde dünnschichtchromatographisch an Kieselgel G überprüft.

Fließmittel I: Chloroform

Fließmittel II: Chloroform, Methanol 9 + 1

Fließmittel III: Chloroform, Ameisensäure 10 + 1

Detektion der Flecke in der Jodkammer.

	I Rf	II Rf	III Rf
PTH-L-alanin	0,30		
PTH-L-valin	0,49		
PTH-L-leucin	0,55		
PTH-L-isoleucin	0,50		
PTH-L-methionin	0,36		
PTH-L-prolin	0,64		
PTH-L-phenylalanin	0,21		
PTH-L-threonin		0,70	
PTH-L-serin		0,60	
PTH-L-asparagin		0,25	
PTH-L-tyrosin		0,65	
PTH-L-glutamin		0,34	
PTH-L-lysin			0,49
PTH-L-asparaginsäure			0,31
PTH-L-glutaminsäure			0,37

	Schmp.	spez.Drehung
PTH-L-alanin	182-184°	$[\alpha]_{546}^{25}$ - 17° c=2,Methanol
PTH-D-alanin	181-183°	$[\alpha]_{546}^{25}$ + 50° c=1, "
PTH-L-valin	208-209°	$[\alpha]_{546}^{32}$ - 46,5 c=1,5 "
PTH-L-leucin	181°	$[\alpha]_{546}^{22}$ - 71° c=1,5 "
PTH-D-leucin	179-180°	$[\alpha]_{546}^{25}$ + 54° c=2 "
PTH-L-isoleucin	175-177°	$[\alpha]_{546}^{22}$ - 32° c=1,5 "
PTH-L-serin	176-178	$[\alpha]_{546}$ - - - -
PTH-L-threonin	195°	$[\alpha]_{546}^{24}$ -105° c=1,5 "
PTH-L-prolin	177°	$[\alpha]_{546}^{32}$ -62° c=2 "
PTH-L-methionin	123-125°	$[\alpha]_{546}^{22}$ - 7° c=1,5 "
PTH-L-asparagin	232°	$[\alpha]_{546}^{24}$ -106° c=1,5,Meth.
PTH-L-asparaginsäure	227-230°	$[\alpha]_{546}^{24}$ - 27° Chlorof. c=1,5,Methanol
PTH-L-glutamin	198-205°	$[\alpha]_{546}^{25}$ - 65° c=1,Methanol
PTH-L-glutaminsäure	166-168°	$[\alpha]_{546}^{25}$ - 23° Chlorof. c=1,Methanol
PTH-L-phenylalanin	187°	$[\alpha]_{546}^{23}$ - 42° c=1,5 "
PTH-L-tyrosin	207-210°	$[\alpha]_{546}^{23}$ - 51° c=1,5 "
PTH-L-lysin	154-155°	$[\alpha]_{546}^{24}$ - 32° c=1 "

Tabelle 5 : 3-Phenyl-2-thiohydantoine (PTH)

Trennung des R,S-Isovalins in optische Antipoden

N-Formyl-R,S-isovalin

14,5 g Rac. Isovalin wurden in 210 ml 98 %iger Ameisensäure gelöst und 70 ml Acetanhydrid in kleinen Anteilen hinzugegeben. Dabei stieg die Temperatur auf 52°. Es wurde 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 80 ml Eiswasser hinzugegeben und die Lösung i.Vak. zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute 14,5 g = 80 %

Schmp. 177-178°

$C_6H_{11}NO_3$ (145,1) Ber.: C 49,64 H 7,64 N 9,65

Gef.: C 49,54 H 7,59 N 9,86

14,35 g N-Formylisovalin und 36,08 g Brucin wurden in 400 ml 85 %igem Äthanol heiß gelöst. Die Lösung wurde langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend noch 1 Std. im Eisschrank bei 0° gehalten. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt und getrocknet. Ausbeute 31,3 g = I.
Nach zwei Umkristallisationen der ersten Fraktion ergab eine Probe aus 1 g Salz gewonnenen N-Formylisovalins eine spez. Drehung [α] +5° in Methanol. Weitere drei Kristallisationen ergaben 14,7 g reines Salz.

12 g Salz wurden in 60 ml Wasser gelöst und die Lösung mit Eis gekühlt. Dann wurden 24 ml n KOH hinzugegeben und 5 Min. geschüttelt. Das ausgefallene Brucin wurde abgesaugt und zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde einmal mit Chloroform und einmal mit Äther ausgeschüttelt. Dann wurde mit 5 n HCl schwach angesäuert und die Lösung i.Vak. eingeengt. Beim Abkühlen kristallisierte optisch aktives N-Formylisovalin aus.

Ausbeute 2,5 g = 34,8 %

Schmp. 176-177° $[\alpha]_{546}^{20}$ +5,5° (c = 1, Methanol)

Aus der Mutterlauge von I fielen nach der gleichen Aufarbeitung wie oben 3,8 g bräunliches Rohprodukt an. Dieses wurde in 20 ml heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Aktivkohle

aufgekocht und filtriert. Nach dem Abkühlen fielen 2,8 g kristallines N-Formylisovalin an = 39 %.

Schmp. 176-177° $[\alpha]_{546}^{20}$ -5° (c = 1, Methanol)

Optisch aktives Isovalin, R-(-)-Isovalin

1 g (-)-N-Formylisovalin wurden in 30 ml 5 %iger methanolischer HCl gelöst und die Lösung 48 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 20 ml Wasser aufgenommen. Die wäßrige Lösung wurde über eine mit 10 g schwach basischem Anionenaustauscher gefüllte Säule gegeben. Es wurde mit 50 ml Wasser nachgewaschen und das Eluat unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 4 ml Wasser gelöst und das Filtrat mit 40 ml Aceton versetzt. (-)-Isovalin kristallisierte in feinen Nadeln aus.

Ausbeute 500 mg = 62 %

Schmp. 250° $[\alpha]_{546}^{20}$ -11,9° (c = 1, Wasser)

$[M]_{546}^{20}$ -13,9° (c = 1, Wasser)

$C_5H_{11}NO_2$ (117,1) Ber.: C 51,26 H 9,46 N 11,96

Gef.: C 50,9 H 9,43 N 12,04

S-(+)-Isovalin

1,6 g (+)-N-Formylisovalin wurden auf die gleiche Weise wie oben mit 45 ml methanolischer HCl gespalten.

Ausbeute 700 mg = 54,2 %

Schmp. 250° $[\alpha]_{546}^{20}$ +10,8° (c = 1, Wasser)

$[M]_{546}^{20}$ +12,64° (c = 1, Wasser)

S-(-)-5-Äthyl-5-methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

200 mg (+)-Isovalin wurden in 5 ml Pyridin und 5 ml Wasser gelöst und die Lösung mit 0,5 n NaOH auf pH 9 eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 ml Phenylisothiocyanat wurde bei 40° Wasserbadtemperatur 1 Std. gerührt. Der pH wurde durch laufenden NaOH-Zusatz konstant gehalten. Nach Aufhören des NaOH-Verbrauchs wurde noch 30 Min. gerührt und die Lösung anschließend zweimal mit Benzol extrahiert. Nach dem Neutrali-

sieren der wäßrigen Phase mit 2 n HCl und leichtem Einengen im Vakuum fiel ein kristallines Produkt an. Es wurde aus 60 %igem Methanol umkristallisiert.
Ausbeute 180 mg = 45 % (Nadeln)

Schmp. 164-165° $[\alpha]_{546}^{20}$ -7° (c=1, Methanol)
Schmp. des Racemats 160-161°

$C_{12}H_{14}N_2OS$ (234,3) Ber.: C 61,52 H 6,02 N 11,96
Gef.: C 61,41 H 6,1 N 12,1

CD Messung c = 1

R-(+)-5-Äthyl-5-methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

200 mg (-)-Isovalin wurden in 5 ml Pyridin und 5 ml Wasser gelöst und auf die gleiche Weise wie oben beschrieben mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Ausbeute 190 mg = 47 %(Nadeln)

Schmp. 163-164° $[\alpha]_{546}^{20}$ +7° (c = 1, Methanol)
CD Messung c = 1

L-5-(3',4')-Dihydroxybenzyl-5-methyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

Eine Mischung von 10 ml H_2O und 10 ml Pyridin wurde 15 Min. lang mit N_2 durchspült. Dann wurde 1 g L-α-Methyldopa hinzugegeben und mit 0,5 n NaOH der pH der Lösung auf 9 eingestellt. Dabei wurde weiter N_2 eingeleitet. Die schwach gelbe Lösung wurde mit 21 Tropfen (0,8 g) Phenylisothiocyanat versetzt und gerührt. Der pH wurde durch laufenden NaOH-Zusatz auf 9 gehalten, die Wasserbadtemperatur auf 40° eingestellt. Bis zum Aufhören des NaOH-Verbrauchs wurde unter N_2-Einleitung 45 Min. gerührt. Danach wurde die Lösung zweimal unter N_2 mit Benzol ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde mit 5 n HCl angesäuert. Da nur ein schmutzig schmieriger Niederschlag fiel, wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand im Exsikkator getrocknet und mit absolutem Äthanol extrahiert. Der Extrakt wurde zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit absolutem Äther aufgenommen und die Lösung wieder zur Trockne eingedampft. Der Rückstand war weiß, lackartig, aber nicht kristallin.
Ausbeute 850 mg = 54,9 %

Schmp. erweicht zwischen 90-130°
Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigt, daß die Substanz verunreinigt ist. Startfleck.
DC an Polyamid, Fließmittel: Chloroform, Methanol 10 + 1, Detektion in der Jodkammer. Hauptfleck Rf 0,55.

Zur Reinigung wurden 300 mg des Rohprodukts auf eine mit 40 g Polyamid gefüllte Säule gegeben. Als Elutionsmittel wurde getrocknetes Chloroform mit 10 % trockenem Methanol verwendet. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 100 Tropfen pro Min. wurden 12 Fraktionen aufgefangen. Die dc Untersuchung zeigte die Reinheit der Fraktionen 4-8. Die Eluate 4-8 wurden vereinigt, abgezogen, mit absolutem Äther aufgenommen, wieder abgezogen und im Hochvakuum über P_2O_5 bei 50° getrocknet.
Ausbeute 150 mg

$C_{17}H_{16}N_2O_3S$	Ber.:	C	62,19	H	4,91	N	8,53	S	9,75
	Gef.:	C	61,6	H	5,3	N	7,2	S	9,2
Mol.-Gew.	Ber.:	328,2							
	Gef.:	328 (massenspektrometrisch)							
		332,9 (osmometrisch)							

$[\alpha]_{546}^{20}$ +21° (c = 1, Methanol)

Die nicht befriedigenden Ergebnisse der Elementaranalyse (Substanz ist wahrscheinlich nicht wasserfrei) erforderten weitere Identitätsproben. $FeCl_3$-Reaktion (grün) beweist das Vorliegen der orthoständigen Hydroxylgruppen am Phenylring. Das UV-Spektrum zeigt den typischen Kurvenverlauf, wie ihn andere 3-Phenyl-2-thiohydantoine zeigen.
UV max. 269 nm (log ε = 4,12).
Das IR-Spektrum (Abb.15) des 5-Methyl-5-(3',4')-dihydroxybenzyl-3-phenyl-2-thiohydantoins zeigt die für Hydantoine charakteristische C=O Valenzschwingung bei 1735 cm^{-1}. Bei 1600 cm^{-1} tritt die Bande der C=C Gerüstschwingungen der Aromaten auf. Die intensive Bande bei 1500 cm^{-1} deutet auf die Gruppierung -C-NH- hin. CH_3 Valenzschwingungen lassen sich an Banden geringer Intensität bei 2920 cm^{-1} und 2965 cm^{-1} erkennen. Die NH Valenzschwingungen im Bereich um 3300 cm^{-1} werden durch die OH Banden verdeckt.

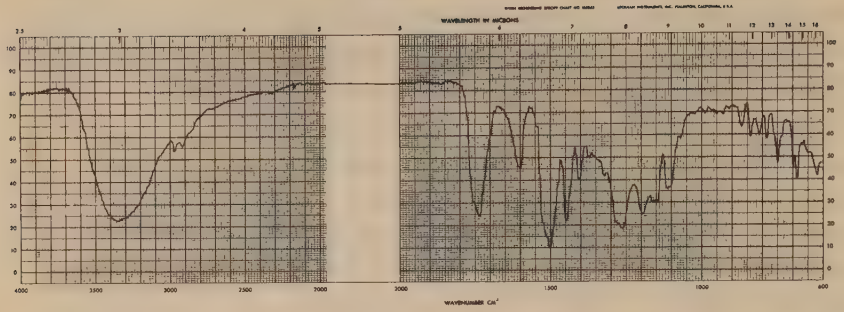


Abb.15: IR-Spektrum des 5-Methyl-5-(3',4')-dihydroxybenzyl-3-phenyl-2-thiohydantoins

Darstellung des D,L-α-Methylleucins (= 2-Amino-2,4-dimethylpentancarbonsäure)

Methode I:

In einem 2 l Rundkolben mit eingeschliffenem Stopfen wurde eine Lösung von 50 g NaCN (1 Mol) in 100 ml Wasser gegeben. 58,9 g NH_4Cl in 140 ml warmem Wasser gelöst sowie 67 ml (1 Mol) konz. Ammoniak wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde gerührt und mit Eiswasser gekühlt, während 100,2 g Methylisobutylketon (1 Mol) in 160 ml Methanol hinzugegeben wurden. Der Kolben wurde darauf fest geschlossen und der Stopfen mit Leukoplast gesichert. Dann wurde 5 Std. lang in einem 60° warmen Wasserbad gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Eisbad gekühlt und dann in 800 ml eiskalte konz. HCl gegossen. Die Lösung wurde darauf bei $0-5^{\circ}$ mit HCl-Gas gesättigt und nach Stehen über Nacht 2,5 Std. am Rückfluß erhitzt.

Am Rotationsverdampfer wurde die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Der aus Aminosäurehydrochlorid und anorganischen Salzen bestehende Rückstand wurde mit 500 ml heißem absolutem Äthanol ausgezogen, abgesaugt und der Rückstand mit 400 ml Äthanol gewaschen. Um anorganisches Material zu fällen, wurden noch 400 ml Äther hinzu-

gegeben. Nach mehreren Stunden wurde abgesaugt. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt, in 2 l Wasser aufgenommen und mit einem Überschuß frisch bereiteten Bleihydroxids behandelt. (Anmerkung 1).
Die Suspension wurde mit 1,5 l Wasser verdünnt und 3 Std. gerührt, bis pH 7 erreicht war. Unter vermindertem Druck wurde auf 2 l eingeengt und vom Niederschlag abgesaugt. Das trübe Filtrat wurde mit H_2S gesättigt und das gefällte Bleisulfid abgesaugt. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt, mit 1 l 96 %igem Äthanol versetzt und am Rückfluß erhitzt. Es wurde vom Ungelösten abgesaugt. Nach dem Erkalten des Filtrats fiel ein voluminöser Niederschlag aus. Er wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Trockenschrank bei 90° getrocknet.
Ausbeute 70 g, alkoholunlöslicher Rückstand 12 g.
Die Produkte zeigten bei dünnschichtchromatographischer Untersuchung identische Rf-Werte. (DC an Kieselgel G: Butanol 40, Eisessig 10, Wasser 10, Detektion mit Ninhydrin.)

Die Elementaranalysen zeigten, daß das alkohollösliche Produkt verunreinigt war.
$C_7H_{15}NO_2$ (145,2)

Lösliches Produkt:	Ber.:	C 57,8	H 10,4	N 9,65
	Gef.:	C 53,8	H 10,6	N 10,6
Unlösliches Prod.:	Gef.:	C 57,79	H 10,38	N 9,8

Die Ausbeute an Rohprodukt (lösl. und unlösl.) betrug 82 g = 56,5 % d.Th.

Anmerkung 1:
1,5 l 2 n NaOH werden tropfenweise unter Rühren zu einer Lösung von 570 g Bleiacetat $[Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3\ H_2O]$ in 1,35 l Wasser gegeben. Der Niederschlag wird auf einem Büchnertrichter gesammelt und sorgfältig mit Wasser gewaschen.

Methode II: 5-Methyl-5-isobutylhydantoin
100 g Methylisobutylketon wurden in 500 ml Äthanol, 65 g KCN wurden in 150 ml Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden

zu einer Suspension von 300 g $(NH_4)_2CO_3$ in 350 ml Wasser in einem 2 l Rundkolben gegeben. Bei 50° Wasserbadtemperatur wurde die klare Lösung 12 Std. lang gerührt. Dann wurde auf 90° erwärmt und solange weitergerührt, bis die CO_2- und NH_3-Entwicklung beendet war (ca. 4 Std.). Dabei wurde die Lösung auf die Hälfte eingeengt. Beim Abkühlen kristallisierte das 5-Methyl-5-isobutylhydantoin aus. Nach 2 Std. Stehen im Eisschrank wurde abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute 115 g = 68 % d. Th.

Schmp. 144-145°

Zur Elementaranalyse wurde aus 30 %igem Äthanol umkristallisiert.

$C_8H_{14}O_2N_2$ (170,2) Ber.: C 56,45 H 8,29 N 16,46

Gef.: C 56,1 H 8,3 N 16,7

D,L-α-Methylleucin

103 g 5-Methyl-5-isobutylhydantoin wurden in 200 ml 60 %iger H_2SO_4 20 Std. lang unter Rühren im Ölbad auf 150° erhitzt. Danach wurde die Lösung in ein 3 l Becherglas gegeben, mit 1 l H_2O verdünnt und in Anteilen mit $BaCO_3$ versetzt. Es wurde gerührt und erhitzt. Bis zur schwach basischen Reaktion wurde $BaCO_3$ hinzugegeben (ca. 400 g). Nach dem Absetzen wurde vom Niederschlag abgegossen, letzterer mit warmem Wasser aufgerührt und auf einem Büchnertrichter abgesaugt. Das Filtrat wurde mit der ersten Lösung vereinigt und bis auf ca. 500 ml eingedampft. Beim Abkühlen fiel ein voluminöser Niederschlag aus verfilzten Nadeln. Dieser wurde abgesaugt. Das Filtrat wurde weiter zur Trockne eingeengt. Der trockene Rückstand wurde mit heißem 96 %igem Äthanol ausgezogen und anschliessend abgesaugt. Die Niederschläge wurden gesammelt und bei 80° im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute 71 g = 81 %

Schmp. sublimiert ab 200°

$C_7H_{15}NO_2$ (145,2) Ber.: C 57,8 H 10,4 N 9,65

Gef.: C 57,71 H 10,21 N 9,79

N-Acetyl-α-methylleucin

60 g rohes α-Methylleucin (0,4 Mol) wurden in 200 ml H_2O suspendiert. Unter Rühren und Kühlen auf 5-10° wurden in kleinen Anteilen 150 g Acetanhydrid (1,5 Mol) und 140 g NaOH in 250 ml H_2O während 2 Std. zugetropft. Der pH mußte dabei immer über 8 bleiben. Im Laufe der Reaktion wurden etwa 600 ml Wasser hinzugegeben, da sonst die Lösung durch einen Niederschlag zu viskos geworden wäre. Nachdem alles hinzugefügt worden war, wurde noch 20 Min. bei Raumtemperatur gerührt und dann mit konz. HCl auf pH 1-2 angesäuert. Der sofort ausfallende Niederschlag wurde abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 50° getrocknet.

Rohausbeute 67,6 g = 77,4 %

Es wurde aus 2 l siedendem H_2O umkristallisiert.

Schmp. 163-164° (Nadeln)

$C_9H_{17}NO_3$ (187,2) Ber.: C 57,5 H 9,14 N 7,47
Gef.: C 57,9 H 9,33 N 7,37

D,L-2,4-Dimethyl-4-isobutyl-2-oxazolin-5-on

60 g N-Acetyl-α-methylleucin wurden in 350 ml Acetanhydrid 6 Std. lang am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde bei 40° Wasserbadtemperatur im Vakuum eingeengt und der Rückstand fraktioniert im Vakuum destilliert.

Ausbeute 40,8 g = 78 %

$Sdp._3$ 68-73°

Das IR-Spektrum zeigt eine sehr intensive Bande bei 1815 cm^{-1}, die der -C=N- Gruppierung zugeordnet werden kann. Eine mittelstarke Bande bei 1683 cm^{-1}, typisch für Lactone und ähnliche Gruppen, entspricht der Carbonylgruppe des Oxazolinringes. Eine NH Amidassoziationsbande im Bereich um 3350 cm^{-1} tritt nicht auf.

Diastereomere l-Menthylester des N-Acetyl-α-methylleucins

Zu einer Natriumsuspension 8,3 g in 400 ml trockenem Benzol (0,36 Mol) wurden 48,7 g l-Menthol (0,32 Mol) gegeben. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde 24 Std. lang stehen gelassen und anschließend 5 Std. am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Vom nicht umgesetzten Na (4 g) wurde abgegossen und die Na-Reste mit 50 ml trockenem Benzol gewaschen. Waschflüssigkeit und die gelbe Lösung wurden vereinigt. 40 g 2,4-Dimethyl-4-isobutyl-2-oxazolin-5-on in 60 ml Benzol wurden hinzugefügt. Die zunächst trübe Lösung wurde schnell orangerot. Es wurde 5 Std. lang gerührt und dann über Nacht stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung dreimal mit 400 ml 10 %iger Essigsäure, zweimal mit 400 ml H_2O, zweimal mit 400 ml einer 2,5 %igen Na_2CO_3-Lösung und schließlich mit 400 ml H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Benzol abgezogen und der gelbe ölige Rückstand in 250 ml n-Hexan unter Erwärmen gelöst. Es wurde 48 Std. auf -20° gekühlt. Der feinkristalline Niederschlag wurde abgesaugt, mit eiskaltem n-Hexan gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute 28 g = 51 % des wahrscheinlich aus 32 g Na-mentholat entstandenen Gesamtesters.

Der Ester I wurde sechsmal aus n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute 10,2 g (lange feine Nadeln)

Schmp. 136-137° $[\alpha]_{546}^{20}$ -59° (c = 2, Methanol)

$C_{19}H_{35}NO_3$ (325,5)	Ber.:	C 70,11	H 10,84	N 4,3
	Gef.:	C 69,9	H 10,78	N 4,4

Die erste Mutterlauge wurde stark eingeengt und mehrere Tage bei -20° im Eisschrank stehen gelassen. Der Niederschlag wurde von der öligen Lösung abgesaugt und getrocknet. Ausbeute 15 g. Es wurde einmal aus 25 ml n-Hexan umkristallisiert. Die übrigbleibenden 8 g Ester, noch gelblich, zeigten keinen scharfen Schmelzpunkt.

Schmp. 100-110°

Wegen zu guter Löslichkeit wurde nicht weiter umkristallisiert.

(-)-N-Acetyl-α-methylleucin

10 g N-Acetyl-α-methylleucinmenthylester Schmp. 135° (0,03 Mol) wurden mit 16 g KOH (0,3 Mol) in 180 ml 50 %igem Äthanol 5 Std. am Rückflußkühler erhitzt. Danach wurde die Lösung auf 80 ml unter vermindertem Druck eingeengt und dreimal mit je 40 ml Benzol extrahiert. Die wäßrige Phase wurde unter Kühlung mit 5 n HCl angesäuert. Nach 2 stündigem Stehen im Eisschrank wurden die Kristalle abgesaugt und getrocknet. Das Filtrat wurde viermal mit je 50 ml Essigester ausgeschüttelt. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit NaCl gesättigtem Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und abgezogen.

Gesamtausbeute 3 g = 52,1 %

Es wurde zweimal aus 25 ml Wasser umkristallisiert.

Schmp. 177-179° $[\alpha]_{546}^{20}$ -9° (c = 2, Methanol)

Schmp. Racemat 162-164°

(+)-N-Acetyl-α-methylleucin

8 g des leichtlöslichen N-Acetyl-α-methylleucinmenthylesters wurden unter den gleichen Bedingungen wie oben behandelt. Das rohe N-Acetylderivat wurde mit Aktivkohle gereinigt.

Ausbeute 2,9 g = 63 %

Schmp. 163-164° $[\alpha]_{546}^{20}$ +3° (c = 2, Methanol)

(-)-α-Methylleucin

1,6 g (-)-N-Acetyl-α-methylleucin wurden in 15 ml 12 %iger HCl 3 Std. lang am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Die gelbe Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und in 20 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde über eine mit 10 g schwach basischem Anionenaustauscher gefüllte Säule gegeben. Es wurde mit 200 ml Wasser nachgewaschen. Die klare Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt.

Ausbeute 1,1 g = 88,6 % (Nadeln)

Schmp. sublimiert ab 235° $[\alpha]_{546}^{20}$ -35° (c=2, Wasser)

$[\alpha]_{546}^{20}$ -27° (c=2, 1,2 n HCl)

(+)-α-Methylleucin

Aus 2 g (+)-N-Acetyl-α-methylleucin wurden unter den gleichen Bedingungen 1,4 g (+)-α-Methylleucin erhalten. Allerdings ist die Substanz optisch nicht rein.

$[\alpha]_{546}^{20}$ +10° (c = 2, Wasser)

(-)-5-Methyl-5-isobutyl-3-phenyl-2-thiohydantoin

300 mg (-)-α-Methylleucin wurden in 5 ml Pyridin und 5 ml Wasser gelöst, der pH auf 9 mit 0,5 n NaOH eingestellt und die Lösung auf 40° erwärmt. Dann wurden 20 Tropfen Phenylisothiocyanat hinzugegeben und unter successivem NaOH-Zusatz 30 Min. lang gerührt. Die klare gelbe Lösung wurde dreimal mit Benzol ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde mit konz. HCl auf pH 1-2 angesäuert und kurz zum Sieden erhitzt. Der Niederschlag wurde nach dem Trocknen aus 70 %igem Methanol umkristallisiert. Ausbeute 360 mg = 66,5 %

Schmp. 186-187° $[\alpha]_{546}^{20}$ -20° (c = 1, Methanol)
Schmp. Racemat 144-145°

CD Messung c = 1

$C_{14}H_{18}N_2OS$ (262,3) Ber.: C 64,1 H 6,92 N 10,68 S 12,2
Gef.: C 64,5 H 7,0 N 10,7 S 12,2

Das IR-Spektrum (Abb. 16) zeigt die charakteristischen Schwingungsbanden der 3-Phenyl-2-thiohydantoine. Bei 1730 cm^{-1} C=O Valenzschwingung. Die sehr intensive Bande bei 1500 cm^{-1} kann der Gruppierung -C(=S)-NH- zugeordnet werden. Schließlich sind bei 1595 cm^{-1} die schwache Bande der aromatischen C=C Gerüstschwingungen, bei 1345 cm^{-1}, 1368 cm^{-1} Deformationsschwingungen der geminalen CH_3 Gruppen und bei 3250 cm^{-1} die NH Bande zu sehen.

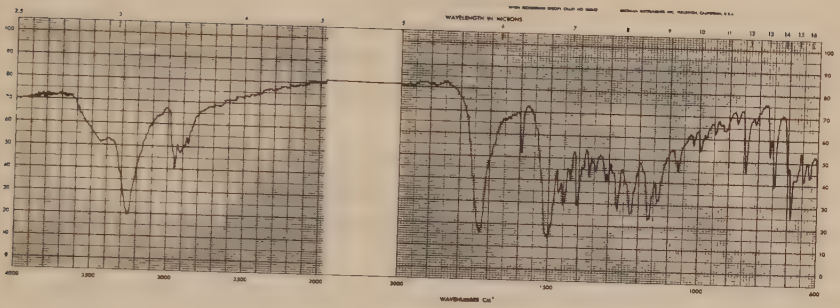


Abb.16: IR-Spektrum des 5-Isobutyl-5-methyl-3-phenyl-2-thiohydantoins

Lebenslauf

Am 12. September 1941 wurde ich, Jens-Georg Hansen, als Sohn des Apothekers Harro Hansen und seiner Ehefrau Ilse, geb. Koch, in Wesermünde geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1948-1952 in Kiel und in Büdelsdorf. 1952 trat ich in das Gymnasium für Jungen in Rendsburg ein und legte dort im Frühjahr 1961 die Reifeprüfung ab. Anschließend leistete ich 15 Monate meinen Wehrdienst bei der Bundesmarine ab. Im Juli 1962 begann ich in der Flora-Apotheke Neumünster meine Ausbildungszeit als Apothekerpraktikant. Sie wurde mit der pharmazeutischen Vorprüfung im März 1964 in Kiel abgeschlossen.

Das Pharmaziestudium nahm ich mit Beginn des Sommersemesters 1964 an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg auf und beendete es dort mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen im April 1967.

Im Juni 1967 begann ich mit der Bearbeitung vorliegender Dissertation am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Auterhoff.

Von Januar bis Dezember 1968 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft, vom 1.Januar 1969 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig. Die Arbeit "Circulardichroismus und Konfiguration von α-Aminosäuren" wurde Ende des Sommersemesters 1969 abgeschlossen.

Im April 1967 heiratete ich die Apothekerin Christa Neumann.

- - - - - - - - - - -

Meine akademischen Lehrer waren - außer Herrn Professor Dr. H.Auterhoff - die Herren Professoren und Dozenten K.W.Merz, H.Möhrle, F.R.Preuß, J.Schumacher (Pharmazie), G.Brauer, M.Hanack, A.Lüttringhaus, H.Suhr, H.Weisz (Chemie), Th. Schmidt (Physik), H.Mohr (Botanik), E.Beuttel, R.Pohl (Pharmakognosie), O.Heidenreich, F.Lembeck (Pharmakologie), K.Hummel (Hygiene), R.Clotten, P.Marquardt (Medizin).